



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétale*

**Intitulé :**

---

**Nouvelles technologies pour l'acquisition d'un blé sans  
gluten : Un espoir pour les cœliaques**

---

Le : 08/07/2021

Présenté et soutenu par : *BENTORCHA Hania & CHIBANE Mohamed Wassim*

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *Mr TEMAGOULT Mahmoud* (MAA - UFM Constantine).

**Encadrante :** *Melle HAMLA Chourouk* (MCB - UFM Constantine).

**Examinatrice :** *Mme BENABDOUN Faïza Meriem* (MCB - UFM Constantine).

*Année universitaire  
2020 - 2021*

# Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
<b>Introduction</b> .....	<b>01</b>

## CHAPITRE I : Le Blé

1. Généralité .....	04
2. Classification botanique.....	04
3. Importance et production .....	05
3. 1. A l'échelle mondiale .....	06
3. 2. En Algérie.....	06
4. Structure et composition du grain de blé .....	07
4.1. Les enveloppes et la couche à aleurone .....	07
4.2. Le germe.....	08
4.3. L'albumen .....	09
5. Les protéines du grain de blé .....	09
5.1. Les protéines métaboliques .....	09
5.2. Les protéines de réserves.....	10
6. Le gluten .....	10
6.1. Constituants et propriétés .....	10
6.2. Interaction des protéines du gluten .....	11

## CHAPITRE II : La Maladie Cœliaque

1. Définition de la maladie cœliaque .....	12
2. Epidémiologie de la maladie cœliaque .....	13
3. Formes de la maladie cœliaque .....	14
4. Physiopathologie de la maladie cœliaque .....	15
4.1. Facteurs génétiques .....	16
4.2. Facteurs environnementaux .....	18
4.3. Facteurs immunologiques .....	18
5. Symptômes de la maladie cœliaque.....	19
6. Différence entre : maladie cœliaque, allergie au blé et intolérance au gluten .....	20
6.1. Maladie cœliaque.....	20
6.2. Allergie au blé .....	20
6.3. Intolérance au gluten .....	20

## CHAPITRE III : Protéolyse du Gluten

1. Définition de la protéolyse .....	21
2. Détoxification des peptides du gluten par protéolyse .....	21
3. Approche enzymatique microbienne .....	21
4. Analyse d'articles portant sur les stratégies d'hydrolyses enzymatiques exogène des peptides cœliaco-actifs.....	23
4.1. L'utilisation de Kuma030 (synthétisées par une modulation d'endopeptidases dérivées d' <i>Escherichia coli</i> ) en tant qu'enzyme thérapeutique pour la maladie cœliaque .....	23
4.2. L'hydrolyse des gliadines avec différentes protéases .....	25
4.3. Les enzymes microbiennes de la chouche comme source de dégradation des gliadines .....	27

## CHAPITRE IV : Méthode de clivage du gluten CRISPR Cas9

1. Historique .....	29
1.1. Qu'est-ce que CRISPR-Cas .....	29
1.2. L'histoire du CRISPR ; Découverte de répétitions palindromiques chez les bactéries et archée.....	30
1.3. Découverte des gènes Cas .....	31
2. CRISPR / Cas9 mode d'emploi.....	32
3. Analyse d'articles portant sur le clivage du gluten par CRISPR / Cas9 .....	33
3. 1. Blé non-transgénique à faible teneur en gluten conçu avec CRISPR / Cas9 .....	33
3. 2. Approche cible $\alpha$ -Gliadine 33-Mer.....	36
3. 3. Approche à cibles multiples $\alpha$ - et $\gamma$ -gliadine .....	39
<b>Conclusion .....</b>	<b>41</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>43</b>

## *Remerciements*

Louange à Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la force de réaliser ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

On profite par le biais de ce mémoire, pour exprimer nos vifs remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

On tient à dire un grand merci à tous nos Professeurs, les Professeurs membres du Jury :

- **Mr TEMAGOULT Mahmoud**
- **Mme BENABDOUN Faïza Meriem**

Qui ont aimablement accepté de juger ce travail, et qui nous ont soutenu et aidé tout au long de notre parcours. Sincères remerciements.

On voudrait remercier particulièrement **Docteur HAMLIA Chourouk**, pour ses remarques, ses explications et l'intérêt qu'elle porte aux étudiants tout comme son suivi minutieux pour que nous ayons la meilleure des formations.

Aussi, on présente notre reconnaissance envers tout le personnel universitaire sans qui tout ce travail n'aurait pu se faire convenablement. Que tout être qui a contribué à mener à bien ce travail trouve ici l'expression de notre immense gratitude.

*Je dédie ce travail accompagné d'un profond amour...*

*À celle qui m'a arrosée de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour intarissable qui m'a béni par ces prières... **Ma mère...** Pour tous ses sacrifices, ses encouragements tout au long de mon parcours. Et à qui, ce travail revient en premier. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point la remercier comme il se doit.*

*À mon support dans la vie, qui m'a appris et m'a dirigé vers le droit chemin... **Mon père...** Pour sa patience, l'éducation qu'il m'a apportée, son soutien pour que je puisse toujours aller plus loin. Aucune dédicace, ne pourrait exprimer avec fidélité, la profonde affection que je lui porte.*

*Que Dieu vous donne une longue vie pleine de santé et de sérénité.*

*À mon très cher frère **Imad** Pour son écoute, sa confiance, et son encouragement.  
À ma petite sœur **Ranim** Pour son humour, ses bêtises et la joie qu'elle nous apporte. Je ne pourrais vous exprimer mon affection et mon attachement pour vous.*

*Que Dieu vous donne beaucoup de bonheur et de réussite.*

*À mon confident, ma moitié : mon fiancé... **Haithem...** Pour tous son aide sans hésitation, son soutien, son encouragement, sa présence à mes côtés et qui a toujours été ma force pour affronter les différents obstacles.*

*Que Dieu tout puissant nous unit pour toujours  
En espérant te voir un des meilleurs chirurgiens.*

*Merci à tous d'avoir cru en moi. Je vous aime énormément...*

*À toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire.*

*À tous les Malades Cœliaques.*

*MERCI.*

A ma maman, qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études armée de patience,  
d'amour et de courage.

Merci d'avoir cru en moi dans les moments où je doutais de ma personne.

Merci d'avoir fait de moi l'homme que je suis.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mes frères **Borhane, Rafik** et leurs petites familles.

A ma sœur, **Bouchra**. Merci d'avoir partagé tes connaissances et ton assiduité.

A ma grand-mère **LaLa Fatiha**.

A mon oncle **Hamoudi**.

A mes tantes **Karima, Souad, Soumicha**.

Et a tous ceux qui m'ont transmis l'amour que je porte à la science et au savoir.

A ma famille, mes proches et amis qui m'inspire force et vivacité.

« *Il faut travailler par gout sinon par désespoir car tout bien pèse travailler est encore la  
meilleur façon d'ennuyer donc de vivre* » **Charles BAUDELAIRE**

A tous ceux que j'aime, merci.

## **Résumé :**

Le blé et ses produits dérivés constituent depuis longtemps la base de notre alimentation. C'est aussi la seule céréale donnant une farine panifiable grâce à la nature unique de ses protéines de réserve qui permettent la formation du réseau de gluten. Ce sont elles qui permettent, après hydratation, l'obtention d'une pâte souple et élastique, indispensable à la panification. Les effets de ces protéines sur la santé de l'être humain sont aujourd'hui au cœur de diverses questions. L'ingestion de gluten chez des sujets dits cœliaques, génère une réaction immunitaire anormale qui entraîne une atrophie des villosités débutant dans la partie proximale de l'intestin grêle et pouvant s'étendre à son ensemble. L'approche thérapeutique adoptée jusque-là consiste à bannir le gluten du régime alimentaire du patient. Afin de palier à l'aspect contraignant de cette approche des stratégies alternatives ont vu le jour. La dégradation enzymatique du gluten comme première approche, abolissant les activités immunogènes et toxigènes de ces protéines. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à trois méthodes essentielles de protéolyse. La seconde stratégie consiste en la technologie CRISPR/Cas9 utilisée afin de réduire la quantité des  $\alpha$ -gliadines dans le grain de blé, fournissant ainsi des lignées avec une immuno-réactivité réduite.

**Mots clés :** blé, gluten, cœliaque, dégradation enzymatique, protéolyse, CRISPR/Cas9, gliadine.

## **Abstract:**

Wheat and its derived products have always been the basis of our diet. It is also the only cereal giving bread flour thanks to the unique nature of its reserve proteins, which allow the formation of the gluten network. They allow, after hydration, to obtain a supple and elastic dough, essential for baking. The effects of these proteins on human health are at the heart of various questions today. The ingestion of gluten in so-called celiac patient generates an abnormal immune reaction which causes atrophy of the villi beginning in the proximal part of the small intestine and which may extend to its whole. The therapeutic approach taken so far has been to ban gluten from the patient's diet. In order to overcome the constraining aspect of this approach, alternative strategies have emerged. The enzymatic degradation of gluten as a first approach, abolishing the immunogenic and toxigenic activities of these proteins. In our study, we were interested in three essential methods of proteolysis. The second strategy is the CRISPR / Cas9 technology used to reduce the amount of  $\alpha$ -gliadins in wheat grain, thus providing lines with reduced immunoreactivity.

**Key words** : wheat, gluten, celiac, enzymatic degradation, proteolysis, CRISPR / Cas9, gliadins.

## ملخص :

لطالما كان القمح و منتجاته أساس نظامنا الغذائي. كما أنها الحبوب الوحيدة التي تعطي دقيق الخبز بفضل الطبيعة الفريدة لبروتيناتها الاحتياطية التي تسمح بتكوين شبكة الغلوتين. التي بدورها تسمح، بعد الترتيب، بالحصول على عجينة طرية ومرنة، ضرورية للخبز. آثار هذه البروتينات على صحة الإنسان هي الآن في صميم العديد من الأسئلة. إن استهلاك الغلوتين عند مرضى الاضطرابات الهضمية، يولد رد فعل مناعي غير طبيعي يؤدي إلى ضمور الزغابات بدءا من الجزء القريب من الأمعاء الدقيقة وقد يمتد إلى كامل الأمعاء. النهج العلاجي المعتمد حتى الآن هو منع الغلوتين من النظام الغذائي للمريض. من أجل التغلب على الجانب التقييدي لهذا النهج، ظهرت استراتيجيات بديلة. التحلل الأنزيمي للغلوتين كأول نهج، يسمح بإلغاء الأنشطة المناعية والسامة لهذه البروتينات. في دراستنا نحن مهتمون بثلاث طرق أساسية لتحلل البروتين. الإستراتيجية الثانية تتمثل في تقنية CRISPR / Cas9 المستخدمة لتقليل كمية  $\alpha$ -gliadines في حبوب القمح، وبالتالي توفير أصناف ذات تفاعل مناعي منخفض.

**الكلمات المفتاحية :** القمح، الغلوتين، الاضطرابات الهضمية، التحلل الأنزيمي، انحلال البروتين،  
gliadine ،CRISPR / Cas9.

**Liste des tableaux**

**Tableau 1:** Classification botanique du blé.....05

**Tableau 2:** Statistiques de consommation des pâtes et le rond de l'Algérie  
parmi les pays dit grand consommateurs de pâtes.....05

**Tableau 3:** Prévalence de la maladie cœliaque dans quelques wilayas de l'est Algérien.....14

### Liste des figures

- Figure 1:** Coupe transversale du grain de blé observé au microscope (X300), entourée en blanc la couche à aleurone.....08
- Figure 2:** Coupe histologique représentant : à gauche une villosité intestinale saine, à droite une villosité atrophiée d'un sujet cœliaque.....12
- Figure 3:** Modèle scientifique de l'iceberg cœliaque selon Fasano et Catassi.....15
- Figure 4:** Interaction entre les différents facteurs d'apparition de la maladie cœliaque.....16
- Figure 5:** Localisation du système HLA au niveau du chromosome 6.....17
- Figure 6:** Dégradation du gluten par kuma030.....24
- Figure 7:** Substitutions d'acides aminés dans l'endopeptidase Kuma030. Modèle d'un térapeptide PQQP représentatif dans le site actif de Kuma030.....25
- Figure 8a:** Détermination des poids moléculaires des gliadines de blé et du degré d'hydrolyse par SDS-PAGE à l'aide de protéases fongiques.....26
- Figure 8b:** Détermination des poids moléculaires des gliadines de blé et du degré d'hydrolyse par SDS-PAGE à l'aide de protéases bactériennes.....27
- Figure 9:** Schéma d'un gène typique de la  $\alpha$ -gliadine indiquant les différents domaines protéiques.....35

### Liste des abréviations

**AV** : Atrophie Villositaire.

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

**ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée).

**FAO** : Food and Agriculture Organization.

**HLA** : Human Leucocyte Antigen (Antigène Leucocytaire Humain).

**kDa** : KiloDalton (unité de mesure de masse moléculaire).

**MC** : Maladie Cœliaque.

**PEP** : Prolyl-EndoPeptidase.

**PMC** : Prévalence de la Maladie Cœliaque.

**RSG** : Régime Sans Gluten.

**SDS-PAGE** : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du dodécyl sulfate de sodium.

**SGNC** : Sensibilité au Gluten Non Cœliaque.

**TG** : Transglutaminase.

# *Introduction*

## Introduction

La maladie cœliaque (MC) est une maladie auto-immune chronique déclenchée par l'ingestion de gluten et des prolamines apparentées chez des individus génétiquement prédisposés (Lamireau et Clouzeau, 2013). Ce constituant protéique se trouve majoritairement dans les céréales, qui occupent une place essentielle dans le régime alimentaire humain depuis la domestication d'espèces sauvages, et plus précisément dans les pays situés au sud du bassin méditerranéen (FAO, 2009).

Cette pathologie est caractérisée par une inflammation de l'intestin grêle se traduisant par une atrophie villositaire associée à des degrés divers de malabsorption et une signature immunologique avec présence d'anticorps spécifiques. L'activation du système immunitaire inné conjointe à celle du système immunitaire adaptatif explique l'inflammation intestinale et les manifestations cliniques qui impactent fortement la qualité de vie des malades (Clot *et al.*, 2001).

Cette entéropathie au gluten a été décrite pour la première fois par Samuel Gee et Francis Adams dès 1887 (Tagzout, 2017), sa fréquence est de 1% de la population. Elle affecte des individus de toutes les tranches d'âge présentant une variété de symptômes. Quand à sa distribution de à travers le monde, elle semble avoir suivi l'évolution des habitudes alimentaires des populations ; consommation de blé, introduction précoce et en quantité du gluten dans l'alimentation des nourrissons (Gujral *et al.*, 2012).

Actuellement, le seul traitement employé afin de soulager les malades se résume à la diététique ; autrement dit l'adhérence perpétuelle et stricte à un régime sans gluten. Tous les aliments contenant le gluten du blé, du seigle et de l'orge ainsi que leurs dérivés sont à bannir. Le but essentiel étant de prévenir les complications de la maladie cœliaque, en particulier l'ostéoporose et les affections malignes (Niewinsky, 2008). Ce traitement est simple dans son principe mais difficile à mettre en œuvre compte tenu des contraintes sociales qu'il impose notamment au fur et à mesure que l'enfant grandit. Il pose un problème d'autant plus conséquent dans les pays où l'alimentation est à base de céréales (Denery-Papini *et al.*, 2001; Cegarra, 2006 ; Schmitz, 2007).

D'autres éventualités offrant moins de restriction sont actuellement à l'étude afin de permettre aux malades d'avoir une alternative au régime sans gluten. La prise en charge du patient résulte de la collaboration de différents professionnels de santé (allergologues, gastroentérologues, diététiciens, nutritionnistes, pharmaciens et biologistes) pour trouver de nouvelles perspectives thérapeutiques. Comme première approche :

La protéolyse qui consiste au fractionnement des protéines en petits éléments. C'est un procédé indispensable qui sert à activer ou à inhiber une protéine cellulaire en nuisant à sa fonctionnalité. Cette dégradation enzymatique du gluten abolissant les activités immunogènes et toxigènes de ces protéines suivant différentes méthodes de protéolyse, parmi ces dernières on a traité trois méthodes imminentes ; en premier, l'utilisation de Kuma030 en tant qu'enzyme thérapeutique pour la maladie cœliaque. En suite, l'hydrolyse des gliadines avec différentes protéases. Et en dernier, l'hydrolyse des gliadines avec différentes protéases.

Une approche moléculaire associée aux biotechnologies, CRISPR/Cas9 s'est révélé comme étant une méthode attrayante. C'est la technique la plus récente et la plus développée jusqu'à présent et récompensé par un prix Nobel en 2020.

Le système CRISPR/Cas9 est un nouvel outil de modification du génome simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule. Il est constitué d'un « ARN guide », qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN. La finalité étant d'éliminer les protéines qui posent problème « gliadine », tout en permettant aux patients de continuer à consommer le blé.

Dans ce contexte, notre travail vise à dresser un état de l'art et à présenter deux solutions alternatives au traitement actuel de la maladie cœliaque. Les deux approches choisies consistent en une hydrolyse enzymatique des peptides cœliaco-actifs et de la nouvelle méthode d'édition du génome CRISPR.

Ce mémoire sera donc agencé comme suit :

- Un premier chapitre qui est consacré au blé, son importance, sa composition et ses protéines en particulier le gluten.

- Le deuxième chapitre parle de la maladie cœliaque, de ses formes, de ces facteurs d'apparition, ainsi que de la différence entre cette pathologie, l'intolérance au gluten et l'allergie au blé.
- Le troisième chapitre traite des stratégies de protéolyses du gluten.
- Le quatrième chapitre est quant à lui présente le système CRISPR, permettant de couper l'ADN et d'édition le génome.

# *Chapitre 1 : Le Blé*

## 1. Généralité

Le blé est à l'origine du mot « culture » sous l'aspect agricole et sociale ; il est aussi à l'origine du tournant décisif de la civilisation, l'homme a agi sur sa nature et a veillé à améliorer sa production ce qui a fait de lui un acteur majeur lors du passage à la révolution néolithique (Mosiniak *et al.*, 2006).

L'ensemble des données collectées indique que le Moyen-Orient est le berceau de la culture du blé. Les principales découvertes ont été faites dans la région qui s'étend de la vallée du Jourdain à l'Euphrate et qui forme un large arc de cercle ou "Croissant Fertile". On y trouve des steppes herbacées où poussent encore des blés sauvages ainsi que les traces des transformations de la plante et des premières activités agricoles. A partir de cette zone initiale, les innovations de nos lointains ancêtres l'ont diffusé vers l'Occident (Mosiniak *et al.*, 2006).

La diffusion du blé vers l'Afrique fut par faite voie terrestre, en premier lieu l'Égypte vers -6 000 avant aujourd'hui et se poursuivit vers le Soudan et l'Éthiopie, au sud, et vers la Libye à l'est. D'autres diffusions furent maritimes : à partir de la Grèce et de la Crète, aussi en provenance du Sud de la péninsule italienne et de la Sicile, parvinrent aux côtes de la Tunisie, du Maroc et de l'Algérie (Bonjean et Angus, 2001).

## 2. Classification botanique

Le blé tendre « *Triticum aestivum* » et le blé dur « *T. durum* » sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde (Debiton, 2011).

Selon Linné la classification botanique du blé est telle que présentée dans le tableau qui suit :

**Tableau 1** : Classification botanique du blé (Mazoyer, 2002).

Règne	Végétale
Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Graminales
Famille	Graminacées (Poacées)
Genre	Triticum
Espèces	Triticum vulgaire aussi appelé T. aestivum

### 3. Importance et production

La farine de blé en contact avec l'eau, forme une masse cohésive due aux protéines de réserves stockées à l'intérieur du grain de blé. Ce phénomène est largement exploité dans l'industrie alimentaire, pour cause il est indispensable à la fabrication du pain (Amrouche, 2012). Le blé joue également un rôle primordial dans la fabrication des pâtes, un aliment indispensable dans toutes les cuisines (Tableau 2).

Selon l'organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), La production mondiale de blé est de 744 millions de tonnes, en Algérie elle est de 2 440 097 de tonnes. Il semblerait également que les Algériens consomment près de 49 millions de baguettes de pain chaque jour, occupant ainsi, le premier rang des consommateurs de pain dans le monde. Nous occupant la 4e place mondiale en termes de qualité du pain, derrière les Français, les Américains et les Philippins (FAO, 2015).

**Tableau 2** : Statistiques de consommation des pâtes et le rond de l'Algérie parmi les pays dit grand consommateurs de pâtes (Amrouche, 2012).

Pays	Kg/année
Italie	28,5
Venezuela	12,5
Algérie	5,8

Le blé est actuellement l'une des seules céréales dont on extrait directement le gluten pour le réincorporer comme additif ou adjuvant dans d'autres produits alimentaires ou dans les farines (Grogna, 2016).

### **3.1. A l'échelle mondiale**

La production mondiale de blé dur au cours du mois de février 2020 a accusé une hausse de 1,7 million de tonnes par rapport au mois de janvier de la même année, atteignant 39,7 millions de tonnes, un bond de 15 % par rapport au résultat de l'année précédente. La production mondiale de blé tendre pour la campagne 2020/2021 est de 731,8 millions de tonnes, soit une augmentation de 5% par rapport à la campagne 2014/2015. Quant à la consommation et aux échanges, ils n'ont cessé d'augmenter (Stassi, 2020).

L'Union Européenne ainsi que le continent Américain sont excédentaires en blé, ce qui constitue un avantage à la fois économique et géopolitique. A contrario, l'Asie et l'Afrique apparaissent déficitaires, ce qui engendre une dépendance à l'égard des grands pays exportateurs (Charvet, 2018).

### **3.2. En Algérie**

Le gouvernement algérien a annoncé une réduction de 35,55 % des importations de blé tendre pour l'année 2020 soit 4 millions de tonnes seront importées contre 6,5 millions de tonnes en 2019. Le facteur majeur ayant induit à cette réduction étant la production nationale de blé qui est en constante évolution. Elle a affiché 6 millions de tonnes, ce qui en fait une quantité encourageante même si elle demeure encore insuffisante par rapport aux besoins nationaux (FAO, 2020).

Cependant selon les prévisions du département d'Etat américain à l'agriculture sur les importations par les pays de l'Afrique du Nord ; le volume de blé importé par l'Algérie devrait augmenter de 15,3 % soit 7,5 millions de tonnes durant la saison 2020/2021. Même si ces prévisions restent incertaines en raison de la baisse des réserves de devises étrangères du pays, liée à la crise économique engendrée par le coronavirus (FAO, 2020).

## 4. Structure et composition du grain de blé

Le fractionnement du grain de blé fait l'objet de nombreuses recherches. En effet afin d'améliorer les procédés d'analyse immédiate ou de séparation des constituants de blé et de mieux valoriser les différentes fractions issues du grain ; il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance de sa structure (Surget et Barron, 2005).

Le grain de blé est un caryopse c'est-à-dire que le péricarpe « la paroi du fruit » est soudée à la graine. Sur l'épi le grain est entouré d'enveloppes : les glumes et les glumelles. Au niveau morphologique le grain de blé est de forme ovoïde et présente sur la face ventrale un sillon qui s'étend sur toute sa longueur (Surget et Barron, 2005).

Globalement, le grain de blé est constitué de trois grandes parties : le germe, l'albumen et les enveloppes.

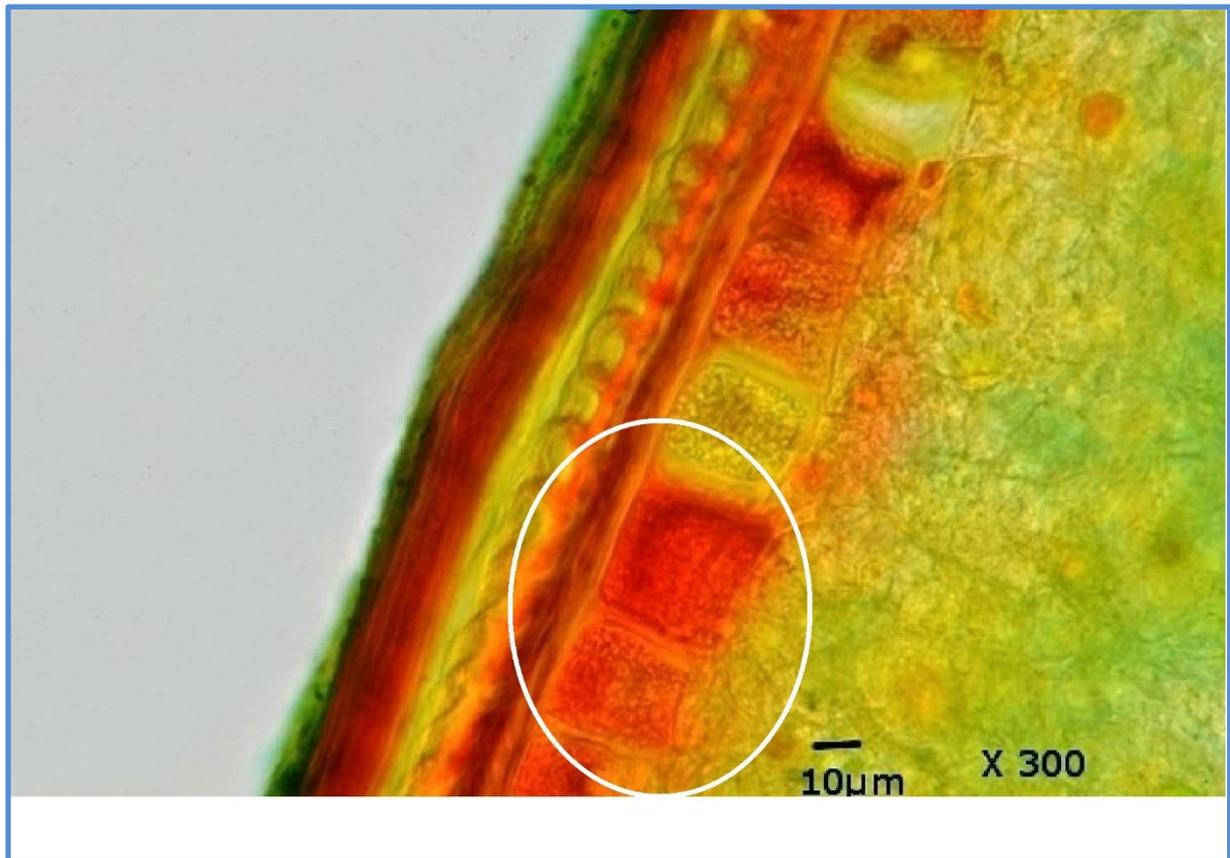
### 4.1. Les enveloppes et la couche à aleurone

La paroi du grain de blé est complexe et elle se divise en 2 parties :

- Le péricarpe est l'enveloppe de la graine de blé.
- L'épiderme du nucelle qui contient l'albumen et la zone germinative.

L'aleurone (Figure 1) ce terme venant du grec « aleuron » et qui veut dire farine, est une protéine présente sous forme de grains dans l'albumen de nombreuses graines. Elle y forme l'assise du tégument (couche à aleurone). Lors de la germination, cette protéine est hydrolysée en acides aminés (Surget et Barron, 2005).

La couche à aleurone après être stimulée par les hormones (émis depuis l'embryon) synthétise des enzymes qui permettent de dissocier l'amidon de l'albumen en sucres nécessaires à la germination et à la croissance des racines (Surget et Barron, 2005).



**Figure 1 :** Coupe transversale du grain de blé observé au microscope (X300), entourée en blanc la couche à aleurone (Surget et Barron, 2005).

#### 4.2. Le germe

Le germe est issu de la fusion des gamètes mâles et femelles, il est riche en albumines, globulines et en lipides et contient également des minéraux, des vitamines ainsi que des sucres solubles. Ce dernier est la partie du grain où le taux d'humidité et la concentration en lipides sont les plus importantes (Pomeranz, 2016).

Il est composé de deux parties (Pomeranz, 2016) :

- L'axe embryonnaire dont la région supérieure est constitué de la gemmule, ébauche de la future tige entourée de coléoptile.
- La radicule (qui perce le péricarpe lors de la germination) recouverte du coléorhize se situe à l'opposé.

### 4.3. L'albumen

Produit par la deuxième fécondation. Il est le plus souvent triploïde, L'albumen représente à lui seul environ 80% du poids d'un grain de blé, Il correspond au tissu de réserve (Pomeranz, 2016).

L'albumen amylicé est essentiellement constitué de granules d'amidon placé dans une matrice protéique composée en grande partie de prolamines (gliadines, gluténines de hauts et de faibles poids moléculaires) mais aussi d'albumines et de globulines. Ces dernières, constituent la source d'acides aminés nécessaires à la germination de la graine (Pomeranz, 2016).

## 5. Les protéines du grain de blé

On distingue deux grandes catégories :

- Les protéines métaboliques : les albumines, les globulines et les amphiphiles.
- Les protéines de réserves : les gliadines et les gluténines.

### 5.1. Les protéines métaboliques

Les protéines métaboliques aussi appelées protéines fonctionnelles du grain de blé, ou encore les protéines cytoplasmiques sont composées : des albumines (solubles dans l'eau), des globulines (solubles dans des solutions salines) ainsi que des protéines amphiphiles (Igrejas *et al.*, 2001).

Les deux premières représentent environ 20% des protéines totales du grain de blé, plus précisément on retrouve 15% d'albumines et 5% de globulines. Elles participent à la formation du grain et à l'accumulation des réserves dans l'albumen (Igrejas *et al.*, 2001).

On retrouve aussi dans cette classe les protéines amphiphiles qui représentent entre 5 et 9% des protéines présentes dans la farine de blé. Elles possèdent un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Ces protéines jouent un rôle important dans la qualité, notamment les puuroindolines qui sont connues pour avoir un effet sur les propriétés technologiques de la pâte (Dubreil *et al.*, 1997 ; Igrejas *et al.*, 2001).

## 5.2. Les protéines de réserves

Les protéines de réserve sont composées des gliadines, (solubles en milieu alcoolique) et des gluténines, (soluble en milieu acide ou alcalin). Ces protéines représentent environ 80% des protéines totales et constituent une réserve d'azote sous forme d'acides aminés utiles au grain lors de la germination (Pincemaille, 2018).

Une modification de la nomenclature existante a été faite en 1986, Shewry ayant proposé de classer les protéines de réserves du blé selon leur teneur en acides aminés soufrés. Ces dernières ont été classées en sous-catégories (Pincemaille, 2018) :

- Les gliadines, qui sont des protéines monomériques, composées d' $\omega$ -gliadines qui sont pauvres en soufre, des  $\alpha$  et  $\beta$  -gliadines ainsi que des  $\gamma$  -gliadines riches en soufre.
- Les gluténines qui sont des prolamines polymériques composées de protéines de plus hauts poids moléculaires (HMW-SG) et de protéines plus riches en soufre et de plus faible poids moléculaires (LMW-SG).

## 6. Le gluten

### 6.1. Constituants et propriétés

Le gluten du latin "glutinum" signifie « lien », ou « colle ». Il est majoritairement composé de constituants protéiques liés entre eux par les ponts disulfures et des liaisons hydrogènes ainsi que de quelques granules d'amidon et de lipides (Pincemaille, 2018).

Cette substance est le produit d'un processus dit lixiviation autrement dit le lavage d'une pâte de blé sous un filet d'eau. Le complexe protéique insoluble qui se forme à la suite de cette dernière possède alors des propriétés viscoélastiques très utiles lors de la fabrication du pain (Pincemaille, 2018).

Les propriétés mécaniques du gluten dépendent essentiellement des gluténines. Les gliadines une fois hydratées possèdent une viscosité beaucoup plus faible que celles des gluténines et leur l'élasticité est beaucoup moins importante (Cornec *et al.*, 1994).

Globalement on considère que la quantité de gluténines va influencer la ténacité de la pâte alors que les gliadines sont à l'origine de son extensibilité et de son gonflement (Wrigley *et al.*, 2006).

## 6.2. Interaction des protéines du gluten

Quelle que soit la protéine, la localisation des cystéines sur les chaînes polypeptidiques permet d'expliquer la formation de ponts intra- et intermoléculaires (Hawkins *et al.*, 1995 ; D'Ovidio et Masci, 2004). Il existe des liaisons disulfures covalentes, et d'autres types de liaisons telles que les liaisons hydrogènes non covalentes et les liaisons hydrophobes qui vont contribuer à la stabilité des structures du gluten (Tatham et Shewry, 1985).

Une haute température affecte la structure secondaire des protéines (Tatham et Shewry, 1985). En effet, lors d'un chauffage du blé de l'ordre de 80°C avec la présence de 20% d'eau (au minimum), une modification de la structure des gluténines en résulte. Altérant ainsi des liaisons cystéines libres, engendrant de nouvelles liaisons avec les gliadines jusqu'à la formation de polymères (Pallos *et al.*, 2006). Il en résulte aussi une perte partielle des hélices  $\alpha$  des gliadines qui restent néanmoins très stables grâce à la présence des liaisons hydrogènes. Ces liaisons hydrogènes seraient également fortement présentes entre les résidus de glutamines et de  $\omega$ -gliadines afin de stabiliser la conformation en spirale des protéines. Des interactions hydrophobes entre ces résidus renforcent également les tours  $\beta$  des  $\omega$ -gliadines (Bietz et Huebner, 1980).

D'après ces différentes observations, il semblerait que les liaisons disulfures joueraient un rôle important : les ponts que forment les cystéines permettent d'expliquer le comportement rhéologique de la pâte à pain. La rupture et la reformation de ces liaisons engendrent une modification du réseau protéique qui rend la ténacité et l'élasticité de la pâte plus ou moins importante. De plus les liaisons non-covalentes et les liaisons disulfures permettent de modifier le réseau de gluténines en un réseau de gluten plus étendu (Bietz et Huebner, 1980).

Pour résumer, bien que les liaisons disulfures soient à l'origine en grande partie de la stabilité des protéines, les liaisons hydrogènes, hydrophobes et non-covalentes impactent également la conformation qu'adoptent les protéines du gluten, et contribuent ainsi aux propriétés élastiques et cohésives du gluten (García-Molina *et al.*, 2020).

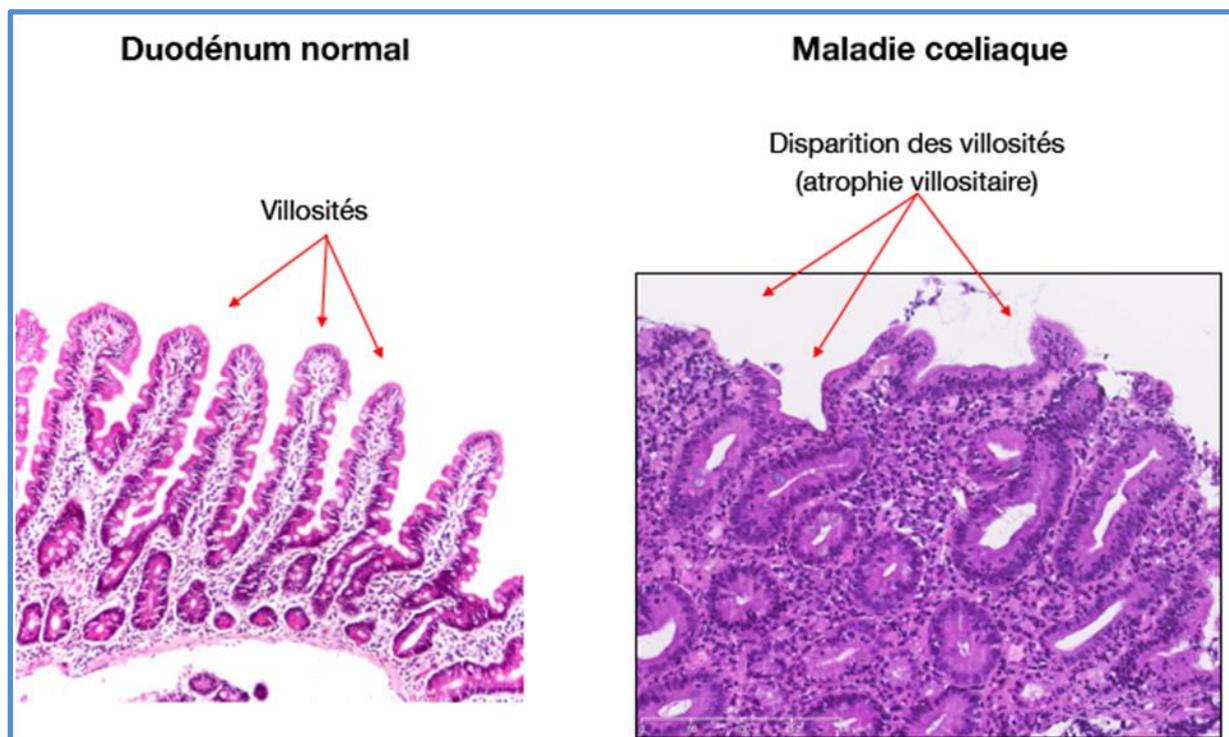
## *Chapitre 2 : Maladie Cœliaque*

## 1. Définition de la maladie cœliaque

L'origine du terme cœliaque est latin « *coeliacus* » venant du mot grec « *koiliakos* », qui signifie Abdomen (Thompson, 2008).

La maladie cœliaque a été définie comme étant une entéropathie chronique d'origine auto-immune qui affecte l'intestin suite à l'ingestion d'aliments qui contiennent du gluten ; par conséquent ça provoque des lésions inflammatoires de la muqueuse intestinale. Il en résulte des troubles digestifs, conduisant à une malabsorption des nutriments aboutissant à des carences diverses. Cette pathologie se développe chez des sujets génétiquement prédisposés qu'ils soient enfants ou adultes (Ludvigsson *et al.*, 2013).

Le gluten qu'on retrouve aussi bien dans les céréales (le blé, le seigle et l'orge) que dans leurs produits dérivés doit être éliminé totalement et définitivement de l'alimentation de ces patients. C'est le fondement même sur lequel se base le traitement de la maladie cœliaque (Farell et Kelly, 2002).



**Figure 2 :** Coupe histologique représentant : à gauche une villosité intestinale saine, à droite une villosité atrophiée d'un sujet cœliaque (Belleannée, 2018).

## 2. Epidémiologie de la maladie cœliaque

Autrefois considérée comme une maladie rare, la prévalence de la maladie cœliaque se situe autour de 1% dans la population générale. Elle est décrite partout dans le monde, il s'agit donc d'une affection cosmopolite (Catassi *et al.*, 2005).

Les études séroépidémiologiques suggèrent que pour chaque patient diagnostiqué il en existerait 3 à 7 non diagnostiqués (Rewers, 2005). C'est pour cela qu'au cours de ces 30 à 40 dernières années; on a remarqué une augmentation des nouveaux cas recensés passant de 3 à 13 nouveaux cas environs pour chaque 100 000 habitants /an (Lohi *et al.*, 2007).

Cette augmentation d'incidence reflète d'avantage une reconnaissance des formes atypiques et silencieuses due à de meilleurs outils de diagnostic (grâce aux tests sérologiques et au dépistage approfondi chez les individus à haut risque) et non pas une réelle augmentation du nombre de nouveaux cas. Cela reflète aussi des différences : dans la prévalence de gènes HLA prédisposant à la maladie ainsi que dans la diversité des régimes alimentaires adoptés (alimentation basée sur le riz ou le maïs ou introduction plus précoce ou plus tardive du gluten). Cela pourraient en effet expliquer les variations étiopathogéniques observées (Dube *et al.*, 2005).

Toutefois, il est à noter que cette pathologie gastro-intestinale reste exceptionnelle chez les noirs Africains, les Chinois et les Japonais. En revanche, Elle est très répandue au Moyen-Orient et en Afrique du Nord avec 1,4%. Une proportion qui reste également élevée dans les pays Européens avec 0,1 à 3,3% (Malamut, 2012). Un autre fait observé est que chez les patients souffrant de d'autres pathologies les pourcentages sont encore plus élevés. C'est notamment le cas pour les sujets atteints de diabétiques de type 1 avec 3 à 6%, chez les sujets ayant une anémie ferriprive avec 3 à 15% et en cas d'ostéoporose avec 1 à 3%. De même que pour les apparentés du premier degré d'un sujet cœliaque avec 10 à 20%. En Algérie, peu de données sont disponibles à ce sujet. On parle surtout de prévalence dans l'est Algérien (Tableau 3) (Boudraa *et al.*, 2008).

**Tableau 3** : Prévalence de la maladie cœliaque dans quelques wilayas de l'est Algérien (Boudraa *et al.*, 2008).

Wilaya	Prévalence (‰)
Guelma	1.4
Khenchla	0.88
Mila	1.7

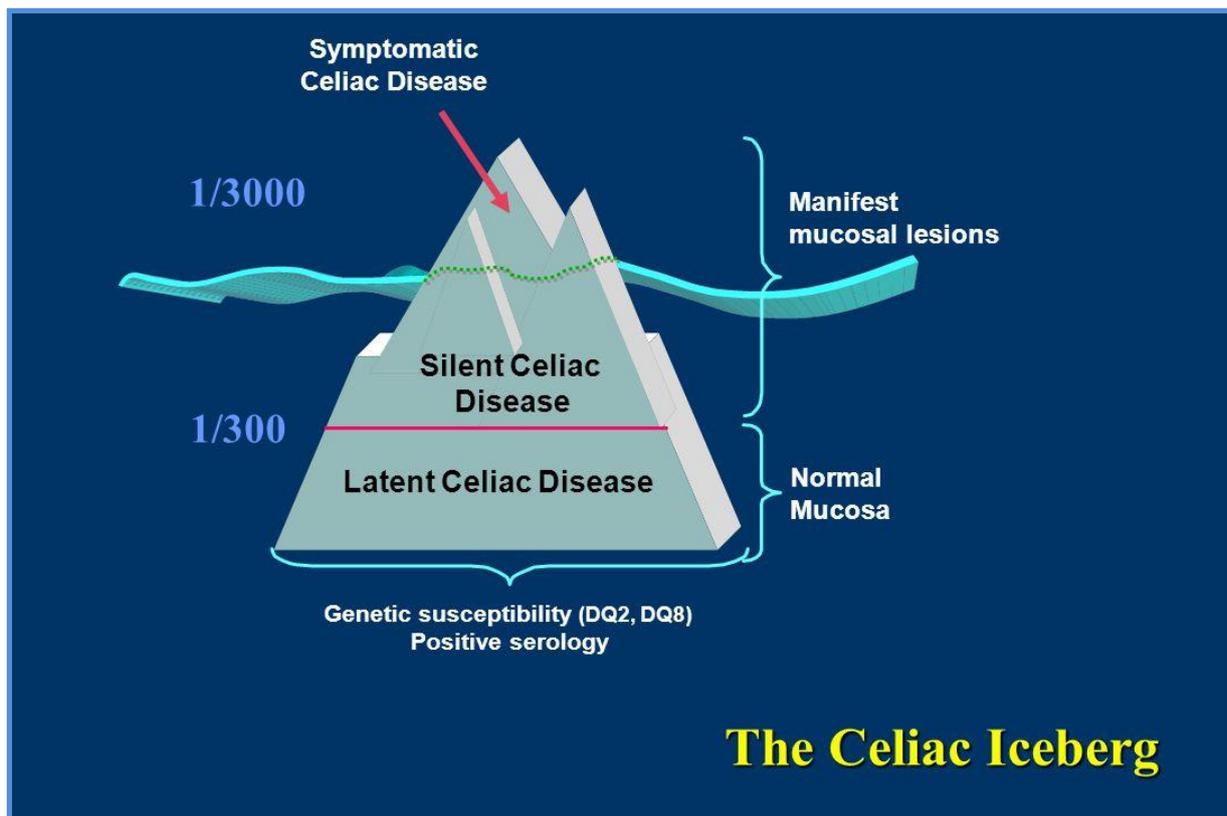
La maladie cœliaque possède deux pics d'incident ce soit dans l'enfance, entre 6 et 24 mois, soit à l'âge adulte, le plus souvent entre 20 et 40 ans. Dans l'enfance, l'âge de révélation pourrait dépendre de la date d'introduction du gluten dans l'alimentation. De plus, on constate une prévalence plus forte de 2 à 3 chez la femme que chez l'homme (Cilleruelo *et al.*, 2016). Cette prédominance féminine, comme pour les autres maladies auto immunes, n'a aucune explication concrète. Certains auteurs l'expliquent éventuellement par le fait que la femme consulte plus pour sa santé par rapport à ces homologues masculins (Pinkhasov *et al.*, 2010).

### 3. Formes de la maladie cœliaque

Les scientifiques se rejoignent sur le modèle de l'iceberg cœliaque (Figure 3) établi par Fasano et Catassi en 2001. Il représente l'ensemble de la population exprimant la susceptibilité génétique à la maladie cœliaque, soit les haplotypes HLA DQ2 ou HLA DQ8 (Lopez, 2014).

Tout en bas de l'iceberg figurent la forme latente, avec l'apparition d'auto-anticorps spécifiques mais sans symptômes et sans lésion histologique de la muqueuse intestinale. Puis, la forme silencieuse de la maladie avec des anticorps positifs et une atteinte histologique mais toujours sans symptômes. Ces deux formes représentent les cas non diagnostiqués et sont donc représentés immergés (Fasano et Catassi, 2001).

Enfin La partie visible de l'iceberg en surface représente les patients qui associent une prédisposition génétique, des anticorps positifs, des lésions intestinales ainsi que des symptômes cliniques présentant la maladie cœliaque dite symptomatique. L'iceberg permet également d'observer que la forme symptomatique est beaucoup moins fréquente que les formes silencieuses ou latentes (Fasano et Catassi, 2001).

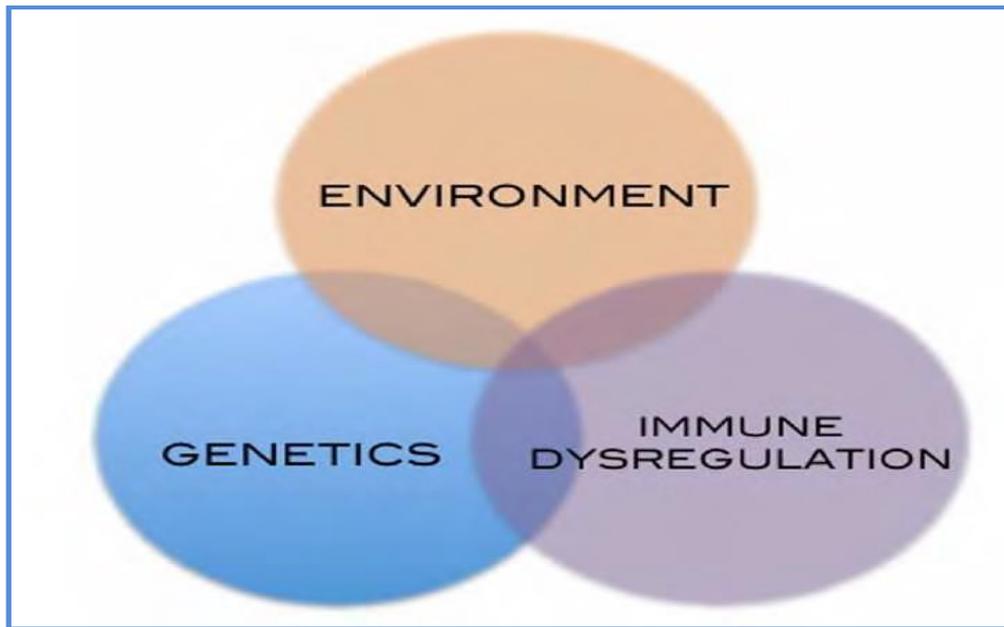


**Figure 3** : Modèle scientifique de l'iceberg cœliaque selon Fasano et Catassi (Lopez, 2014).

#### 4. Physiopathologie de la maladie cœliaque

Dès le début des années 2000, de nombreuses études sur les caractéristiques de la maladie cœliaque ont été effectuées. La pathogenèse de la maladie et la physiopathologie restent incomplètement comprises (Catassi et Lionetti, 2015).

Il s'est avéré que cette pathologie est multifactorielle, elle comporte un effet complexe d'interaction entre un antigène alimentaire qui est un facteur environnemental, la muqueuse intestinale d'un individu (génétiquement prédisposé) et une défaillance immunitaire (Figure 4) (Kagnoff, 2007 ; Briani *et al.*, 2008 ; Tkoub, 2008).



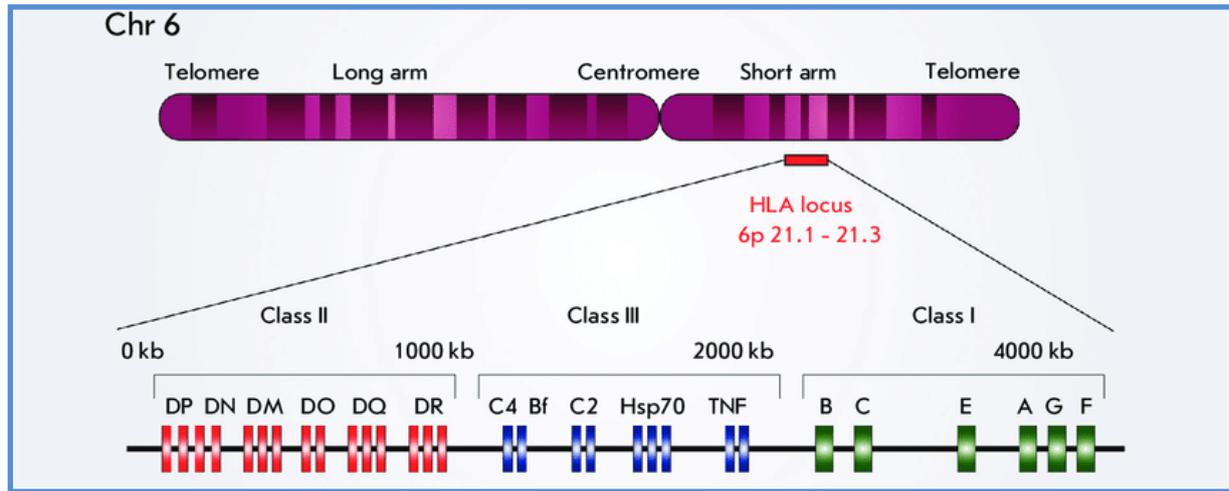
**Figure 4 :** Interaction entre les différents facteurs d'apparition de la maladie cœliaque (Briani *et al.*, 2008).

#### 4.1. Facteurs génétiques

La maladie cœliaque possède une forte composante héréditaire puisque qu'elle survient chez des patients génétiquement prédisposés. Des études de concordance entre jumeaux et la constatation d'agrégation familiale ont permis de suspecter le phénomène de prédisposition génétique. La fréquence d'apparition de cette pathologie chez les parents de premier degré des sujets atteints est de 20% et le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes est de 70% à 90%. En revanche elle n'est que de 10% à 30% chez les jumeaux dizygotes (Polenko *et al.*, 1981).

La maladie est étroitement liée au Complexe Majeur d'Histocompatibilité « CMH » chez l'humain, aussi appelé « HLA » Antigène Leucocytaire Humain. Les patients génétiquement prédisposés expriment une molécule du système HLA de classe II de type DQ2 ou DQ8. Ces molécules sont responsables de la présentation des antigènes aux cellules immunitaires principalement les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Ces molécules sont les plus fortes et les mieux caractérisées des facteurs génétiques de susceptibilité à la maladie cœliaque (Malamut et Cellier, 2010).

Les gènes du système « HLA » se situent sur le bras court du chromosome 6 et sont divisés en trois classes (I, II, III), les types DQ2 et DQ3 se localisent au niveau de la classe II comme le montre la Figure 5 (Zakharova *et al.*, 2019).



**Figure 5 :** Localisation du système HLA au niveau du chromosome 6  
(Zakharova *et al.*, 2019)

Plus de 90 à 95 % des patients atteints de maladie cœliaque sont porteurs du système HLA de classe II de type DQ2 et les 5 à 10% restants sont porteurs de HLA de type DQ8. Cependant, les personnes saines possèdent également cette molécule avec un pourcentage entre 20 à 30 %. De ce fait, la présence de ces groupes ne signifie pas nécessairement une atteinte de la maladie. Seul un faible taux de ces personnes développeront éventuellement cette affection au cours de leur vie étant donné que d'autres facteurs génétiques ou environnementaux sont aussi impliqués dans son déclenchement (Green *et al.*, 2015 ; Gargouri *et al.*, 2017).

On a démontré que de multiples autres gènes étaient impliqués dans ce processus, notamment ceux associés à la production de protéines intervenant dans le contrôle de la perméabilité intestinale. La gliadine pénétrerait au niveau de la muqueuse, du fait d'une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients cœliaques. De plus l'association entre d'autres gènes intervenant dans des maladies auto-immunes avec ceux de la maladie cœliaque accroît la possibilité de développer les deux pathologies en même temps. Par exemple la combinaison diabète de type 1 et système HLA DR3-DQ2 / DR4-DQ8 confère un risque très élevé (Nion-Larmurier et Cosnes, 2009).

## 4.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux interviennent également dans l'évolution de la maladie cœliaque dont le facteur déclencheur primaire est le gluten, en particulier chez le jeune enfant. L'absence de l'allaitement maternel, l'introduction trop précoce des farines alimentaires ainsi que le seuil d'exposition au gluten ont un effet positif sur le développement de cette affection. C'est le cas notamment lors de l'introduction du gluten avant 3 mois ou après 7 mois (Mouterde *et al.*, 2008).

L'agent exogène : Gluten, représente la masse élastique obtenue en pétrissant longuement de la farine de blé ou d'autres céréales. La protéine incriminée est appelée gliadines chez le blé, sécalines pour le seigle, hordéines pour l'orge. Ces protéines (fragments immunogéniques) sont caractérisés par des teneurs élevées en glutamine et en proline qui les rendent résistants à la dégradation par le suc gastrique, pancréatique et par les enzymes de la bordure en brosse intestinale car ceux-ci ne dispose pas de l'activité prolylendopeptidase (Farell et Kelly, 2002).

D'autres facteurs exogènes ont été impliqués dans la pathogénicité de la maladie, comme les infections intestinales virales (adénovirus, rotavirus) qui augmentant l'expression d'HLA DQ (Mouterde *et al.*, 2008).

## 4.3. Facteurs immunologiques

La maladie cœliaque se situe au carrefour entre auto-immunité et désordre génétique. Il s'agit d'une réponse immunitaire anormale contre certains peptides contenus dans le gluten. Durant les étapes de digestion, la gliadine échappe aux étapes de digestion et ayant la capacité de passer à travers l'épithélium digestif va stimuler le système immunitaire. L'affinité de la gliadine est fortement augmentée par des modifications biochimiques due à la transglutaminase. Ces enzymes sont responsables de la désamination des peptides des gliadines et jouent un rôle clé dans la présentation de l'antigène ainsi que dans l'activation lymphocytaire qui en découle. On a observé une surexpression duodénale et une activité accrue des transglutaminases chez les patients cœliaques. Les anticorps ainsi développés ne bloquent donc pas l'activité de la transglutaminase mais au contraire la stimule ; ce augmente la perméabilité épithéliale et vasculaire (Godat *et al.*, 2013).

## 5. Symptômes de la maladie cœliaque

On en décrit un millier. Mais le symptôme prédominant de la forme clinique typique est l'infléchissement ou cassure de la courbe de poids, puis de taille après l'introduction de la farine contenant du Gluten. Accompagné de: **(Bellaiche, 2018)**.

- Syndrome de malabsorption digestive fait de diarrhée chronique grasseuse (Stéatorrhée), ballonnement abdominal.
- Dénutrition avec aspect de fesses tristes (amyotrophie), diminution du pannicule adipeux et pli de dénutrition.
- Pâleur cutanéomuqueuse (faisant évoquer une anémie ferriprive).
- Troubles du comportement avec apathie, tristesse et anorexie.
- Diminution du rapport : périmètre crânien / périmètre brachiale.

Dans les formes cliniques atypiques on peut trouver :

- Dans un ¼ des cas une constipation.
- Retard statural (par carence en vitamine D) ou pubertaire isolé sans troubles digestifs.
- Anorexie isolée.
- Douleurs abdominales isolées.
- Hippocratisme digital.
- Koïlonychie et cheveux cassants par carence martiale résistante à la supplémentation per-os.
- Apathose buccale (fait discuter également une maladie de Crohn).
- Troubles du comportement isolés.
- Troubles de la coagulation par carence en vitamine K.
- Œdème et épanchement par hypo albuminémie.

Dans les formes rares mais évocatrices :

- Dermate herpétiforme.
- Altération de l'émail dentaire.
- Rachitisme vitamino-résistant.
- Hépatite cœliaque.
- Douleurs osseuses.

- Aménorrhée primaire ou secondaire.
- Difficultés d'apprentissage ou baisse des résultats scolaires.

## **6. Différence entre maladie cœliaque, allergie au blé et intolérance au gluten**

### **6.1. Maladie cœliaque**

Comme vu auparavant la maladie cœliaque est une maladie génétique auto-immune, qui se développe en réaction à l'ingestion du gluten. Ceux qui va provoquer une atteinte histologique avec une atrophie villositaire et les différents symptômes qui en découlent (Ludvigsson *et al.*, 2013).

### **6.2. Allergie au blé**

Tandis que, l'allergie au blé est une réaction d'hypersensibilité de type 1 qui peut se faire contre l'une des nombreuses protéines que contient le blé. Contrairement à la maladie cœliaque ou il y'a une production d'anticorps type IgA et IgG (avec des signes cliniques qui se révèlent sur plusieurs semaines voire plusieurs mois) l'allergie au blé provoque une production d'anticorps de type IgE. Accompagné d'une réaction inflammatoire spontanée de quelques minutes à quelques heures. Cette réaction d'hypersensibilité peut aller jusqu'au choc anaphylactique et à l'œdème de Quincke, mais sans pour autant entrainer une atrophie villositaire. Le diagnostic grâce au Prick test cutanée ou par dosage des IgE spécifiques (De-Boissieu, 2009).

### **6.3.Intolérance au gluten**

Quant à l'intolérance au gluten ou autrement dit la Sensibilité au Gluten Non Cœliaque (SGNC), elle est un diagnostique en procédant par élimination, puisque qu'on trouve quasiment les mêmes symptômes de la maladie cœliaque mais sans maladie cœliaque. Par conséquent les patients n'ont pas de prédispositions génétiques, il n'y a pas de production d'anticorps anti-transglutaminase ou d'anticorps anti-gliadine, il n'y a pas d'atteinte histologique ou d'atrophie villositaire. Le diagnostic se fait à fortiori après régression des symptômes suite à l'éviction du gluten de l'alimentation (Khater et Cellier, 2018).

# *Chapitre 3 : Protéolyse du Gluten*

## 1. Définition de la protéolyse

La protéolyse décrit le fractionnement des protéines en plus petits éléments, ainsi que les polypeptides ou les acides aminés. C'est un procédé indispensable qui sert à activer ou à inhiber une protéine cellulaire en nuisant à sa fonctionnalité. En plus de supporter de nombreux fonctionnements corporels indispensables et de régler la dégradation des protéines, la protéolyse s'est avérée jouer une fonction clé dans quelques maladies (Varshavsky, 2001).

Elle a également elle-même été employée dans la chimie de la transformation des produits alimentaires, ainsi que l'hydrolyse enzymatique exogène des peptides cœliaco-actifs dans la perspective d'une exploitation dans les alternatives thérapeutique de la maladie (Hegde, 2008).

## 2. Détoxification des peptides du gluten par protéolyse

Généralement, il existe deux alternatives d'hydrolyse (Loponen, 2006) :

- Hydrolyser les peptides du gluten toxiques après ingestion, dans le tractus gastro-intestinal (l'approche médicale).
- Ou bien les hydrolyser avant l'ingestion du gluten (l'approche technologique alimentaire).

La détoxification du gluten par protéolyse n'est pas une idée nouvelle, pas plus que l'utilisation de plus d'une protéase dans un processus de détoxification efficace. Par exemple, Messer et ses collaborateurs ont montré que la papaïne brute (qui contient plusieurs activités protéolytiques diverses) pouvait détoxifier le gluten, alors qu'une protéinase de papaïne purifiée n'ont n'avait plus l'aptitude (Messer *et al.*, 1964).

## 3. Approche enzymatique microbienne

La dégradation du gluten peut être réalisée par des prolyl-endopeptidases (PEP). Ce sont des protéases, trouvées principalement dans les plantes et les micro-organismes (Hausch *et al.*, 2002).

Les prolyl-endoropeptidases d'origine microbienne sont des enzymes endoprotéolytiques qui, contrairement à la protéase gastro-intestinale humaine, peuvent facilement cliver les peptides du gluten immunostimulants (Hausch *et al.*, 2002).

Les enzymes bactériennes ou fongiques peuvent se prêter aisément à une fabrication à grande échelle (Piper *et al.*, 2004 ; Stepniak *et al.*, 2006).

Une prolyl-endoropeptidase produite par *Flavobacterium meningosepticum*, a montré un effet hydrolysant sur un peptide 33-mère (le 33-mère étant riche en proline : 13 résidus et en glutamine : 10 résidus), qui est l'un des peptides les plus puissamment impliqués dans le déclenchement de la maladie cœliaque (Shan *et al.*, 2002 ; Piper *et al.*, 2004). L'utilisation de cette endopeptidase a été proposée pour une thérapie orale pour les patients atteints de MC (Shan *et al.*, 2002). Des études *in vivo* avec des rats ont confirmé ces résultats, car la perfusion de PEP avec des peptides de gluten dans l'intestin du rat a accéléré la digestion du peptide de gluten *in vivo* de 50 à 100 % (Piper *et al.*, 2004). Dans une étude de suivi, Pyle et ses collaborateurs ont montré que le prétraitement du gluten avec la PEP de *F. meningosepticum* évitait le développement d'une malabsorption des graisses ou des glucides chez la majorité des patients testés ayant ingéré quotidiennement un supplément de gluten (5 g) au cours d'une épreuve d'une durée de 14 jours (Pyle *et al.*, 2005). Des propriétés similaires (détoxification du gluten) ont été obtenues avec le PEP de *Myxococcus xanthus*, de *Sphingomonas capsulata* (Shan *et al.*, 2004 ; Gass *et al.*, 2005) et de *Lactobacillus helveticus* (Chen *et al.*, 2003).

Néanmoins, des résultats contradictoires ont été observés concernant la PEP de *F. meningosepticum*. Matysiak-Budnik et ses collaborateurs ont montré que l'hydrolyse du même peptide 33-mère n'était pas complète et conduisait à la libération de peptides potentiellement immunogènes (Matysiak-Budnik *et al.*, 2013). De plus, Shan ainsi que Stepniak et leurs équipes ont rapporté que les PEP sont inactivés par la pepsine et les conditions acides dans l'estomac (Shan *et al.*, 2004 ; Stepniak *et al.*, 2006).

Par conséquent, Stepniak et son équipe ont introduit l'utilisation d'une nouvelle enzyme (une prolyl-endoropeptidase) *d'Aspergillus niger*. Cette dernière semble être stable dans des conditions gastriques (pH 2,0) et active de manière optimale à un pH de 4 à 5. Elle est également totalement résistante à la digestion avec la pepsine et dégrade efficacement les protéines du gluten (Stepniak *et al.*, 2006).

De plus, elle peut être utilisée comme supplément oral pour réduire la consommation du gluten chez les patients. Un autre avantage à utiliser cette enzyme est qu'elle peut être produite à faible coût et de qualité alimentaire en milieu industriel (Stepaniak *et al.*, 2006).

#### **4. Analyse d'articles portant sur les stratégies d'hydrolyses enzymatiques exogène des peptides cœliaquo-actifs**

Nous avons réalisé une recherche de données dans la littérature internationale concernant les stratégies enzymatique utilisées pour dégrader les peptides toxiques induisant la maladie cœliaque, puis une analyse des articles concernés a été entreprise.

##### **4.1. L'utilisation de Kuma030 (synthétisées par une modulation d'endopeptidases dérivées d'*Escherichia coli*) en tant qu'enzyme thérapeutique pour la maladie cœliaque (Wei *et al.*, 2015)**

###### **➤ Objectif**

Évaluer le potentiel de Kuma030 en tant qu'enzyme thérapeutique et l'observation de son interaction avec les protéines du gluten.

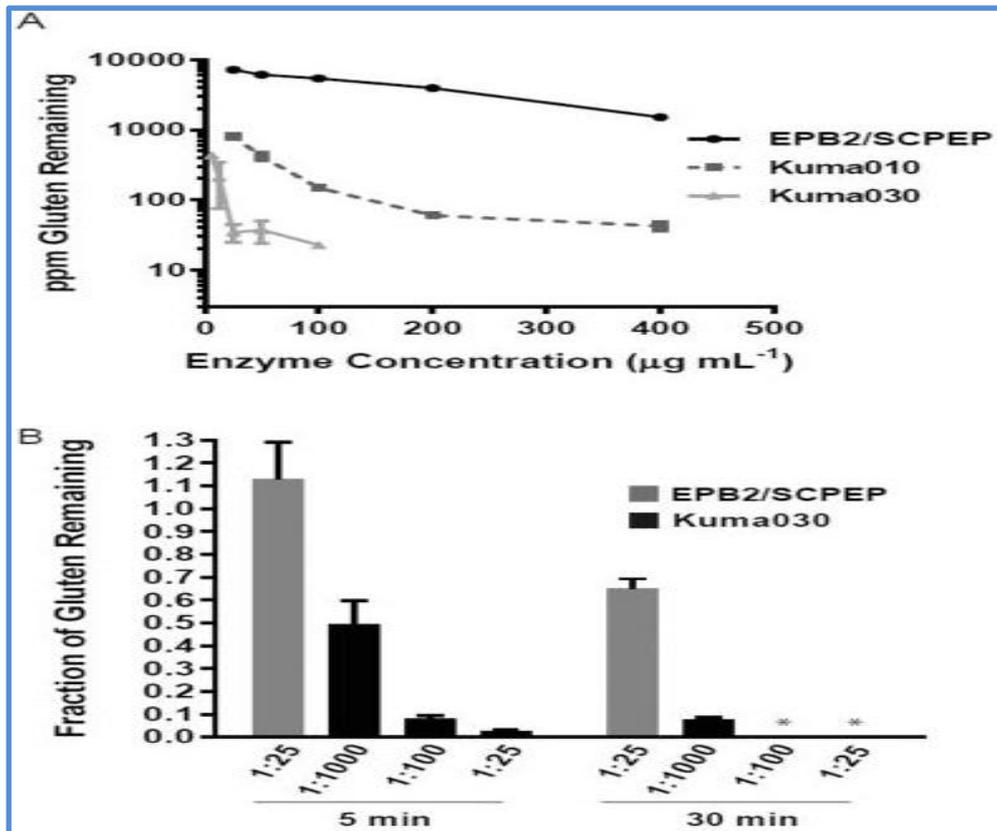
###### **➤ Méthode utilisée**

Le gluten entièrement purifié a été incubé avec Kuma030 ou avec SCPEP (le serine carboxipeptidase precursor expression protein) et EPB2 (expression in *Escherichia coli* of the proenzyme precursor B2) dans des conditions gastriques (pH 4.0, 37 ° C avec 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de pepsine). La fraction du gluten restante après la dégradation a été quantifiée à l'aide de tests ELISA.

###### **➤ Résultats**

Kuma030 a montré une capacité de dégradation rapide et efficace des régions immunogènes du gluten dans les conditions gastriques. Comparativement, elle a été plus efficace que les enzymes EPB2 et SCPEP (Figure 6). EPB2 et SCPEP éliminent 70 à 79% du gluten. Quant à Kuma030, elle a comptabilisé une dégradation > 99,97%, atteignant ainsi la limite de quantification par test ELISA (Figure 6). Elle est capable de dégrader tous les épitopes du blé, de l'orge et du seigle.

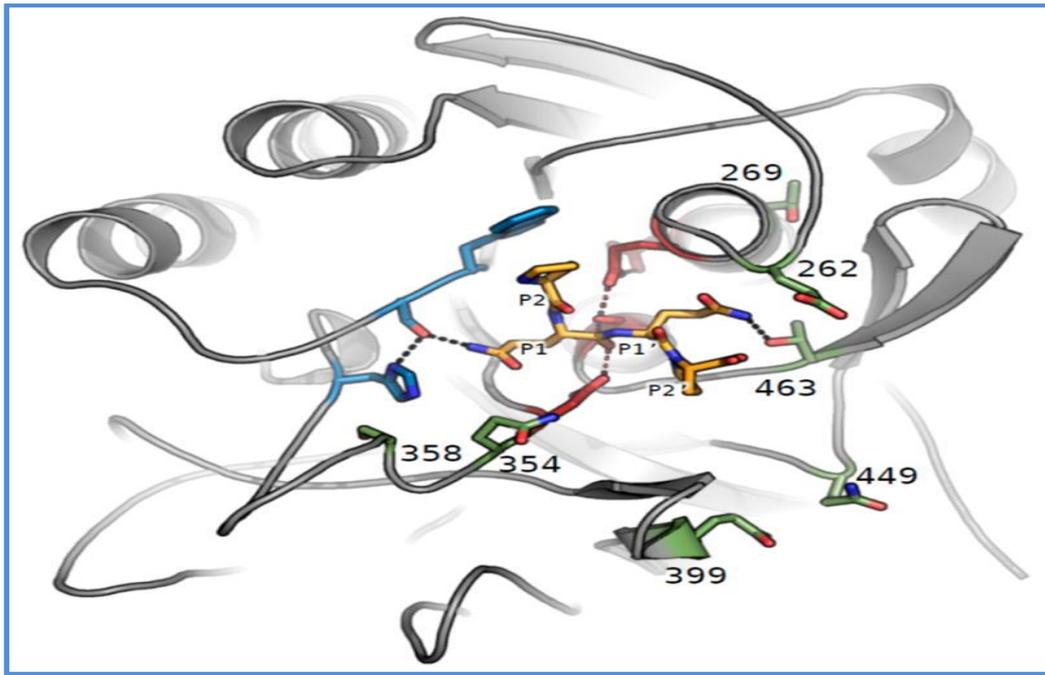
En effet, le traitement des aliments avec Kuma030 a permis de réduire la charge de gliadine de plus de 99% en quelques minutes. Les futurs travaux détermineront le potentiel de cette enzyme en tant qu'élément du traitement de la maladie cœliaque (Wolf *et al.*, 2015).



**Figure 6 :** Dégradation du gluten par kuma030 (Wolf *et al.*, 2015).

(A) concentrations d'EPB2 et de SCPEP (dans un rapport de 1:1), de Kuma010 ou de Kuma030 dans des conditions gastriques, telles que mesurées par ELISA à l'aide de l'anticorps G12. La concentration de départ de gluten était de 10 mg mL<sup>-1</sup> (10 000 ppm). Notez que l'axe Y est tracé sur une échelle logarithmique.

(B) La quantité de gluten détectée à 5 ou 30 min après incubation avec EPB2 et SCPEP ou Kuma030. Le rapport enzyme/gluten est indiqué. La concentration de départ de gluten était de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Les échantillons ont été normalisés à la quantité de gluten restant après incubation avec de la pepsine seule. L'astérisque indique que plus de 99,9 % du gluten a été dégradé.



**Figure 7 :** Substitutions d'acides aminés dans l'endopeptidase Kuma030. Modèle d'un tétrapeptide PQQP représentatif dans le site actif de Kuma030 (Johannes *et al.*, 2016).

Le squelette de l'enzyme Kuma030 est représenté en gris, le tétrapeptide de gliadine est représenté en jaune. Les résidus verts ont été mutés pour générer l'enzyme. On pense que les résidus bleus sont importants dans la coordination du tétrapeptide dans le site actif (Johannes *et al.*, 2016).

#### 4.2. L'hydrolyse des gliadines avec différentes protéases (Socha *et al.*, 2015)

##### ➤ Objectif

Evaluer la modification enzymatique des gliadines de blé par des prototypes de champignons (*Aspergillus sp*, *A. oryzae* et *A. niger*) et de bactéries (*Bacillus licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. thermoprotéolytique* et *Streptomyces gris*).

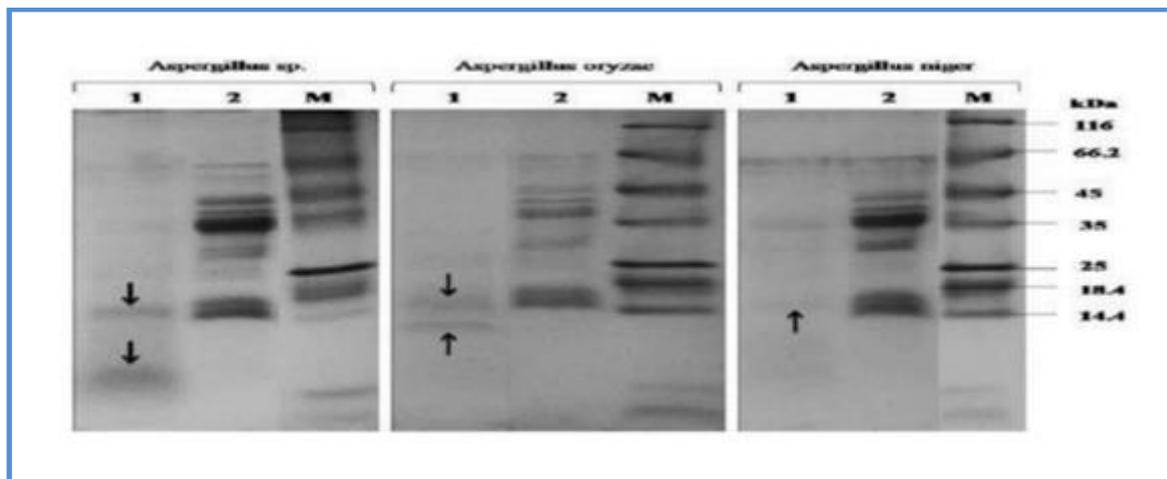
##### ➤ Méthode utilisée

Les gliadines de blé ont été préparées par fractionnement discontinu du complexe protéique de céréale. Puis l'incubation des gliadines avec les protéases fongiques et bactériennes. Le degré d'hydrolyse et la détermination des poids moléculaires des peptides ont été réalisés par SDS-PAGE.

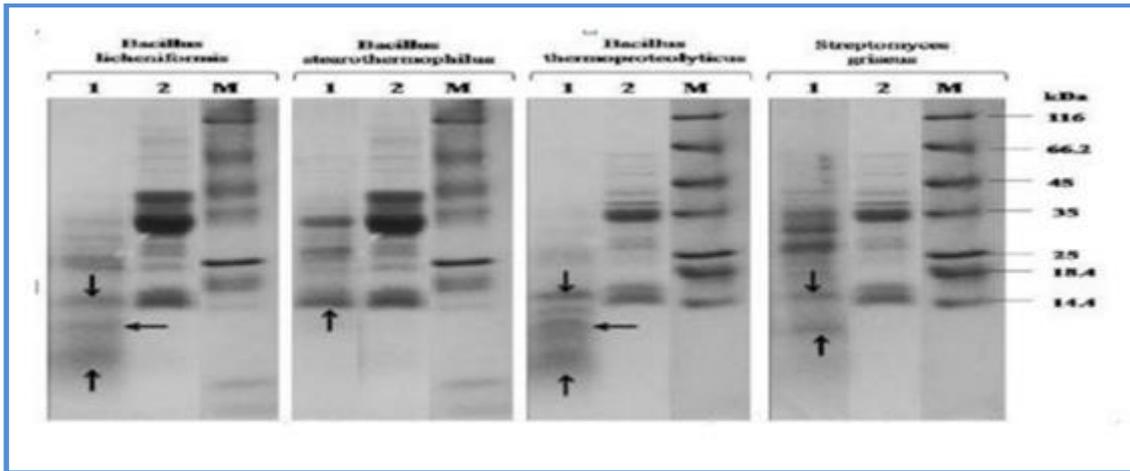
➤ **Résultats**

Parmi les protéases fongiques, l'activité protéolytique la plus efficace a été observée avec la protéinase d'*A. niger*. Les peptides des gliadines de faible poids moléculaire étaient complètement dégradés. Les protéases bactériennes de *B. licheniformis* et de *B. thermoproteolyticus* ont été très efficaces sur les peptides de poids moléculaire inférieur à 15kDa.

Globalement toutes les protéases bactériennes (quel que soit leur origine) présentaient de légères différences dans le degré de protéolyse. *B. licheniformis* et *B. thermoproteolyticus* ont agi de manière très efficace, les produits sont de poids moléculaire inférieurs (Figure 8a et 8b).



**Figure 8a :** Détermination des poids moléculaires des gliadines de blé et du degré d'hydrolyse par SDS-PAGE à l'aide de protéases fongiques spécifiques isolées d'*Aspergillus sp*, *A. oryzae* et *A.niger*. 1: Gliadines de blé traitées avec des protéases fongiques ; 2: Gliadines de blé non traités ; M : Marqueur de poids moléculaire ; les flèches indiquent les peptides après hydrolyse.



**Figure 8b** : Détermination des poids moléculaires des gliadines de blé et du degré d'hydrolyse par SDS-PAGE à l'aide de protéases bactériennes spécifiques isolées de *Bacillus licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. thermoprotéolytique* et *Streptomyces gris*. 1: Gliadines de blé traitées avec des protéases bactériennes ; 2: Gliadines de blé non traitées ; M : Marqueur de taille ; les flèches indiquent les peptides après hydrolyse.

#### 4.3. Les enzymes microbiennes de la bouche comme source de dégradation des gliadines (Helmerhorst *et al.*, 2010)

##### ➤ Objectif

Evaluer le rôle des enzymes microbiennes de la bouche dans la dégradation des gliadines  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ .

##### ➤ Méthode utilisée

Un mélange contenant une variété de gliadines  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  a été ajouté à une suspension de bactéries de la plaque dentaire et un tampon salivaire.

Après divers intervalles de temps d'incubation, des aliquotes de 100  $\mu$ l ont été prélevées et portées à ébullition pour inhiber l'activité enzymatique. Les produits de dégradation ont été analysés par SDS-PAGE.

➤ **Résultats**

Les gliadines se colorent peu avec le bleu de Coomassie et apparaissent comme des bandes majeures dans la région 35–47 kDa. Des traces d'albumine, de globulines et de gluténines, peuvent également être présents, mais leur contenu est probablement faible.

Après une incubation d'environ 6 h avec des bactéries de la plaque dentaire, les gliadines avaient subi une dégradation consistante et étaient pratiquement indétectables après une incubation de 24 h, alors qu'elles étaient stables uniquement dans le tampon ionique de la salive.

Il s'agit d'une preuve attestant de l'existence de microorganismes dégradant le gluten associé au tractus gastro-intestinal supérieur. De tels microorganismes peuvent jouer un rôle dans la digestion du gluten alimentaire et ainsi dans la protection contre la maladie cœliaque chez les sujets à risque.

Helmerhorst et ses collaborateurs ont démontré que les bactéries dégradant le gluten résidé naturellement dans la cavité buccale. Par la suite Zamakhchari et son équipe ont identifié un microbe oral *Rothia aeria* pouvant dégrader les peptides immunogènes du gluten. Globalement, plusieurs études ont montré que le GIT humain (Tractus Gastro-Intestinal humain), l'intestin grêle et le microbiote du côlon peuvent être impliqués dans l'hydrolyse du gluten (Caminero *et al.*, 2014).

*Chapitre 4 : Méthode de Clivage du  
Gluten CRISPR Cas9*

## 1. Historique

Au début des années 1960s les scientifiques bombardaient des plantes avec des radiations dans l'espoir de causer des mutations aléatoires dans le code génétique et d'étudier leur impact. Puis, au fur et à mesure les méthodes et les outils à disposition sont devenus plus précis. À la fin des années 1970s les premiers séquençages génétiques apparaissent. L'avancée et l'accessibilité de ces techniques de séquençages. Ces techniques ont permis la réalisation de bases de données regroupant des génomes de nombreux organismes, incluant l'homme (Gilbert et Maxam, 1973 ; Sanger *et al.*, 1977).

En parallèle l'utilisation et la découverte d'enzymes (ligases, polymérase et enzymes de restrictions) et de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces travaux ont permis d'isoler les gènes et d'y introduire des mutations, que ce soit *in vitro* au sein des cellules, ou chez des modèles animaux (Mullis, 1987).

Grâce à ces techniques, la compréhension des mécanismes génétiques s'est approfondie et le génie génétique s'est développé. Le système CRISPR et plus particulièrement le système CRISPR-Cas9 qui représente aujourd'hui l'outil le plus simple d'utilisation en génie génétique et il promet d'être l'un des plus spécifiques (Baptiste, 2017).

### 1.1. Qu'est-ce que CRISPR-Cas ?

Les procaryotes (bactéries et archées) sont constamment sujets aux attaques virales. Ces virus appelés bactériophages évoluent rapidement et leur biomasse surpasserait celle des bactéries. Les procaryotes sont donc soumis à une pression virale, par conséquent leur évolution s'est accompagnée d'un ensemble de défenses innées pour repousser ces prédateurs (Baptiste, 2017).

Récemment un nouveau système de défense a été découvert, il fut appelé le système CRISPR (pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated genes). Le détournement de ce système se révélera être un excellent outil biotechnologique (Baptiste, 2017).

## **1.2. L'histoire du CRISPR; Découverte de répétitions palindromiques chez les bactéries et archée**

Elle débute en 1987, au Japon. Atsuo Nakata, chercheur à l'Université d'Osaka, découvre des séquences répétées d'ADN dans le génome de la bactérie *Escherichia coli* (Shino *et al.*, 1987).

Ces séquences seront nommées « CRISPR » pour « Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats », ou « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées ». Ce sont des séquences d'ADN de virus que les bactéries ont intégrées à leur propre génome (Baptiste, 2017).

En 2007, une équipe de chercheurs travaillant pour une entreprise laitière danoise, en collaboration avec l'équipe de Sylvain Moineau en biochimie et de microbiologie à l'Université Laval). Ils ont observé un phénomène ; certaines des bactéries utilisées pour la production de yogourt sont protégées contre les bactériophages, un type de virus particulier qui s'attaque aux bactéries. Ces scientifiques remarquent que ce sont les séquences CRISPR qui confèrent cette protection (Barrangou *et al.*, 2007).

Dès lors jaillit l'hypothèse qu'il s'agit d'une sorte de système immunitaire primitif développé par les bactéries pour se protéger. Agissant un peu comme un vaccin, ces séquences répétées provenant de virus sont gardées en mémoire dans le génome de la bactérie après une première infection pour l'aider à combattre d'éventuelles invasions (Barrangou *et al.*, 2007).

C'est finalement en 2012 qu'intervient la découverte qui fera de CRISPR. Deux chercheuses, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, l'une française et travaillant à l'Université d'Umeå en Suède, l'autre américaine et chercheuse à l'Université de Californie à Berkeley, mettent en lumière le fonctionnement et les applications du système CRISPR pour l'édition génétique (Jinek *et al.*, 2012).

À l'origine du CRISPR se trouvent donc ces séquences répétées d'ADN viral présentes dans le génome des bactéries. Comme pour un gène classique, ces fragments d'ADN seront transcrits en une molécule composée d'ARN (Jinek *et al.*, 2012).

Dans le cas d'un gène, cet ARN sert d'intermédiaire pour produire une protéine à partir de l'information contenue dans l'ADN. Dans le cas des séquences CRISPR, l'ARN est utilisé comme une sonde qui sert à reconnaître les virus (Jinek *et al.*, 2012).

Ces sondes pourraient être comparées aux anticorps de notre système immunitaire : elles patrouillent dans la cellule à la recherche de leur ADN complémentaire, c'est-à-dire l'ADN viral. Si une infection survient, le virus sera donc reconnu et pourra ensuite être éliminé. En effet, l'autre composante du CRISPR, une enzyme coupeuse d'ADN nommée Cas9, entre alors en action : l'ADN du virus sera dégradé à l'endroit reconnu par la sonde et il ne pourra plus se multiplier, ce qui contrecarerra l'infection (Jinek *et al.*, 2012).

Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna voient dans ce système de défense antiviral un outil permettant de manipuler l'information génétique avec une facilité déconcertante. L'idée est simple : détourner le système CRISPR pour qu'il s'attaque non plus à l'ADN d'un virus, mais à celui d'une cellule hôte, ce qui permettra d'éditer son génome. Le scientifique doit simplement créer des sondes d'ARN artificielles qui reconnaissent le gène d'intérêt et les introduire, accompagnées de l'enzyme Cas9, dans la cellule. Le système CRISPR agissant comme un véritable bistouri génétique, la Cas9 sera dirigée vers le gène ciblé et le coupera à l'endroit précis indiqué par la sonde (Jinek *et al.*, 2012).

Pour la recherche biomédicale, le potentiel du CRISPR est considérable. En utilisant des cellules embryonnaires d'animaux de laboratoire, un animal dont toutes les cellules porteront la modification génétique peut être créé. Ces modèles permettent, par exemple, de désactiver un gène pour étudier sa fonction, de réprimer l'expression d'un gène associé à l'apparition du cancer, ou même, en utilisant le potentiel de réparation de l'ADN déjà présent dans les cellules, de modifier la séquence d'un gène, c'est-à-dire d'y introduire une nouvelle mutation ou d'en corriger une existante, dans le cas d'une maladie génétique par exemple. La liste de ces applications ne cesse de croître (Baptiste, 2017).

### **1.3. Découverte des gènes Cas**

En 2002, à l'Université d'Utrecht, Jansen et son équipe firent une découverte qui permettrait de mieux comprendre la biologie des séquences CRISPR. (Roublin, 2017).

En étudiant leur environnement ils observèrent qu'elles étaient toujours accompagnées par des familles de gènes qui étaient retrouvées seulement si les séquences CRISPRs étaient aussi présentes. Ces gènes seraient appelés « Cas », pour CRISPR Associated. Initialement quatre gènes sont identifiés (Cas 1 à 4), un gène Cas1 était toujours associé aux CRISPRs. L'étude des séquences des gènes Cas montra qu'ils codaient probablement pour des domaines hélicases et nucléases 38–40. La protéine codée par le gène cas3 montrait des motifs caractéristiques des hélicases de la superfamille 2, tandis que la protéine Cas4 comportait des motifs de la famille RecB des exonucléases (des domaines destinés à délier et à couper les acides nucléiques) (Roublin, 2017).

Ces observations suggéraient que les protéines codées pouvaient être impliquées dans le métabolisme de l'ADN ou l'expression génique. La proximité géographique des séquences Cas avec les séquences CRISPR et la nature de leur produit amena à penser qu'il existait un lien entre les deux. Ils constitueraient le système CRISPR-Cas (Roublin, 2017).

## **2. CRISPR / Cas9 mode d'emploi**

CRISPR / Cas est un complexe formé d'une protéine Cas9, capable de couper l'ADN et d'une séquence d'ARN (sgRNA) qui permet la reconnaissance d'une séquence d'ADN ciblée. Pour pouvoir utiliser CRISPR-Cas, il faut des connaissances préalables sur le ou les gènes que l'on veut modifier et avoir un objectif d'amélioration précis. Il faut également maîtriser l'ingénierie cellulaire (dans l'espèce et le génotype d'intérêt) car la modification de l'ADN se fait lors de la réparation de la cassure par la cellule végétale. Une réparation parfaite (la très grande majorité des cas de cassure spontanée) n'apporte aucun changement (Malhet, 2016).

Les modifications possibles (Malhet, 2016) :

- Une coupure – simple – sans réparation induit une mutation qui rend généralement le gène non fonctionnel.
- Une réparation avec un « modèle » (une séquence homologue modifiée) induit une modification du gène et de sa fonction. Le remplacement d'allèles n'est pas effectué en routine actuellement. Il est testé par exemple pour lutter contre un potyvirus de la tomate. Cette méthode peut élargir de manière ciblée la base génétique d'une plante.

- Une réparation avec un modèle contenant de l'ADN étranger induit une insertion ciblée d'un transgène (transgénése).

### **3. Analyse d'articles portant sur le clivage du gluten par CRISPR/cas9**

L'occurrence aléatoire de délétions sur les sites cibles des gènes de la gliadine signifient que l'édition de gènes produira initialement des plantes avec une mosaïque de gènes modifiés, supprimés et non affectés. Cela nécessite des méthodes efficaces pour détecter les plantes avec des modifications, afin de pouvoir réduire rigoureusement le nombre de plantes dans un programme grâce à des étapes de sélection axées sur la qualité (Jouanin *et al.*, 2020).

Le clivage peut se faire au niveau de l'ADN (le nombre de gènes présents et leurs séquences après édition), au niveau des protéines ou pour la qualité boulangère et l'immunité (Jouanin *et al.*, 2020).

Nous avons fait une analyse d'articles portant sur trois méthodes de clivage qui ont été utilisées dans les études CRISPR / Cas9 sur le gluten dans le blé.

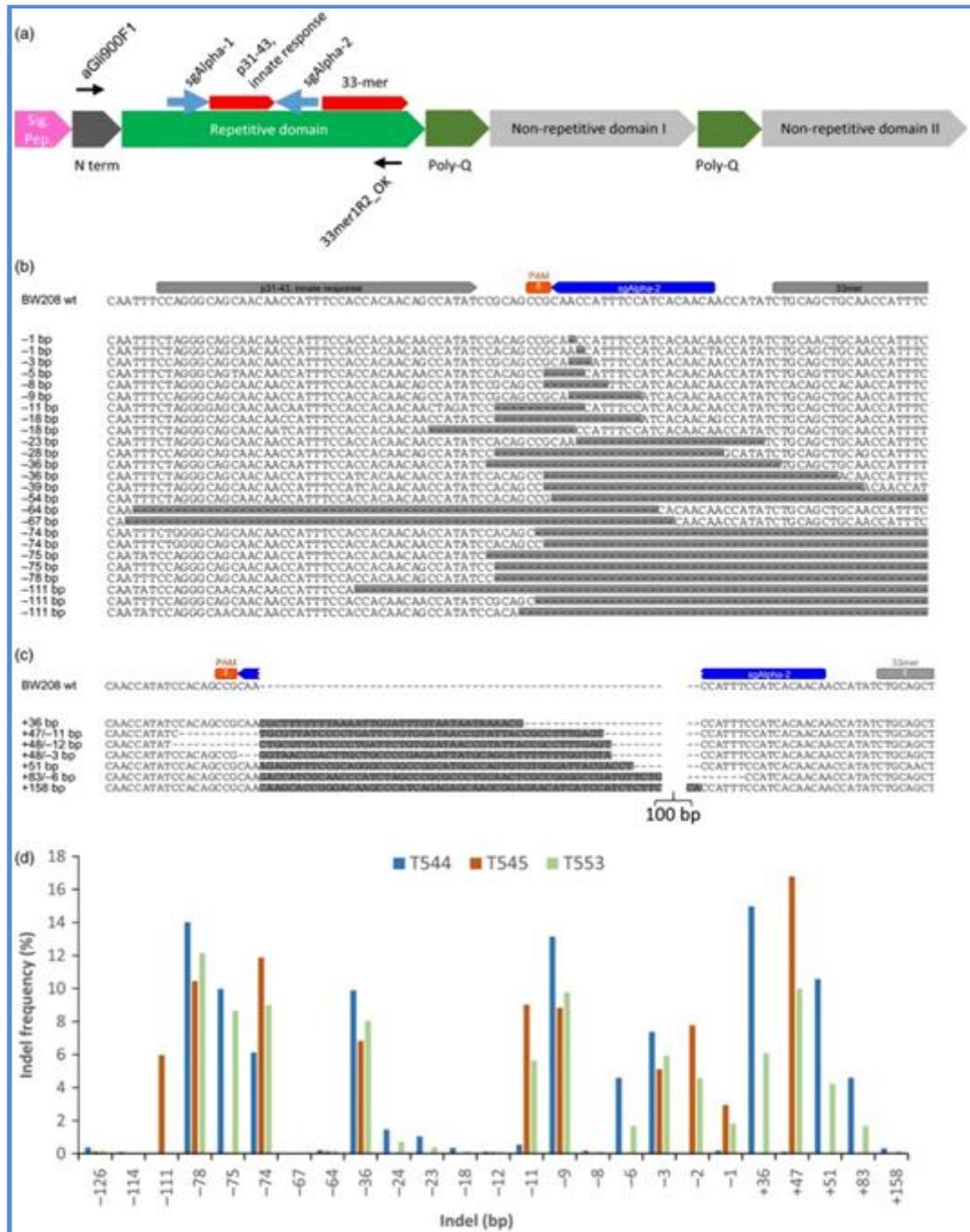
#### **3.1. Blé non-transgénique à faible teneur en gluten conçu avec CRISPR/Cas9 (Jouanin *et al.*, 2020)**

Afin de modifier spécifiquement les gènes immunoréactifs de l' $\alpha$ -gliadine, deux sgRNA (sgAlpha-1 et sgAlpha-2) ont été conçu (Figure 9). Ces deux ARN guides vont cibler des régions conservées adjacentes à la séquence codante pour l'épitope immunodominant dans le gluten du blé. Il s'agit d'un peptide de 33 acides aminés (dit 33-mer). En raison de la complexité du locus Gli  $\alpha$  2 et du nombre élevé de copies des gènes codant pour la gliadine ; les méthodes de sélection traditionnelle et la mutagenèse n'ont pas réussi à produire du blé à faible teneur en gluten. Vingt et une lignées mutantes ont été générées, toutes montrant une forte réduction des  $\alpha$  gliadines et jusqu'à 35 gènes différents ont été mutés (Jouanin *et al.*, 2020).

L'immunoréactivité des lignées de blé éditées par CRISPR a été réduite de 85 %, comme l'ont révélé les tests ELISA R5 et G12. Des lignées sans transgène ont été identifiées et aucune mutation hors cible n'a été détectée dans aucune des cibles potentielles (Jouanin *et al.*, 2020).

Les technologies CRISPR / Cas9 et ARNi sont toutes deux très efficaces pour obtenir des lignées de blé dépourvues d'épitopes de la maladie cœliaque. Cependant, les principaux avantages des knock-outs CRISPR par rapport à l'ARNi sont que (i) les knock-outs CRISPR induisent des mutations stables et héréditaires qui n'impliquent pas l'expression d'un transgène, et (ii) par conséquent, ils fournissent un phénotype indépendant des conditions environnementales. De plus, CRISPR/cas9 permet l'emploi de différentes stratégies tel que : couper des fragments de chromosomes plus gros contenant des gènes de gliadine, ou même plus, le remplacement de fragments hautement immunogènes par d'autres moins toxiques, en conservant la fonctionnalité des gliadines. En revanche, pour obtenir tous les gènes de gliadine mutés par CRISPR / Cas9, des cycles ultérieurs de mutagenèse seront nécessaires en utilisant des sgRNA spécifiques pour cibler les gènes de gliadine restants (Jouanin *et al.*, 2020).

Les lignées de blé à faible teneur en gluten et sans transgène ainsi obtenues constituent une avancée sans précédent, et les lignées résultantes constituent une excellente source pour les programmes de sélection végétale afin d'intégrer le caractère à faible teneur en gluten dans les variétés de blé d'élite (Jouanin *et al.*, 2020).



**Figure 9 :** Analyse des résultats. Edition des gènes des  $\alpha$ -gliadines dans le blé panifiable. Schéma d'un gène typique de la  $\alpha$ -gliadine indiquant les différents domaines protéiques (Jouanin *et al.*, 2020).

Deux des séquences peptidiques impliquées dans l'intolérance au gluten (p31- 43 et le 33-mer) sont représentées par des flèches rouges, tandis que les séquences cibles des sgRNAs (sgAlpha-1 et sgAlpha-2) sont représentées par des flèches bleues. Les flèches noires indiquent les amorces utilisées pour le séquençage d'Illumina (Jouanin *et al.*, 2020).

(b–d) Séquençage Illumina des gènes de la  $\alpha$  gliadine de lignées mutantes T1 BW208 (T544, T545 et T553) transformées avec sgAlpha-2. (b) Alignement des différents types de délétions trouvés au locus cible de sgAlpha-2 ; (c) Alignement des différentes insertions au locus cible de sgAlpha-2 ; et (d) la fréquence des différents types d'insertions et de suppressions (Jouanin *et al.*, 2020).

### 3.2. Approche cible $\alpha$ -Gliadine 33-Mer (Sanchez-León *et al.*, 2018)

Sanchez-León et son équipe se sont concentrés sur une série de techniques analytiques pour effectuer une évaluation approfondie des événements modifiés par les gènes sur trois générations (T0 à T3) (Sanchez-León *et al.*, 2018).

Il s'agissait de comprendre les effets et l'efficacité de CRISPR / Cas9 afin d'obtenir un produit final sans danger pour les cœliaques. Leur pipeline n'était donc pas principalement destiné à être une pipeline de sélection séquentielle conçu pour réduire le nombre de lignées mutantes et ne retenir que les mutants « les plus prometteurs ». La pipeline comportait quatre étapes (Sanchez-León *et al.*, 2018) :

#### Etape 1 :

Séquençage d'ADN par technique Illumina pour caractériser l'ADN extrait de feuilles récoltées à partir de plantes transgéniques T1 et les types sauvages correspondants pour mesurer la fréquence et les types d'indels. Des suppressions jusqu'à 126 pb et des insertions jusqu'à 158 pb ont été trouvées. Il a été observé que, la plupart des délétions dans la région cible ( $\alpha$ -gliadines possédant le fragment de peptide 33-mère contenant l'épitope immunodominant) étaient des multiples de 3 pb; des délétions de -3, -9, -36 et -78 pb ont été observées à des fréquences élevées dans les trois lignées mutantes T1 sélectionnées pour le cultivar de blé tendre transformé. Des fréquences élevées de -1 et +1 pb induisant un décalage du cadre de lecture (typiques pour les mutations CRISPR / Cas9) n'ont cependant pas été trouvées (Sanchez-León *et al.*, 2018).

#### Etape 2 :

Par la suite, pour évaluer l'impact des mutations observées sur la composition protéique du gluten des graines, les graines T1 de plusieurs dizaines de plantes chacune comportant cinq plantes T0 ont été testées qualitativement pour les changements de

composition protéique à l'aide d'Acid- et SDS-PAGE, puis analysées quantitativement par MALDI-TOF et confirmé par HPLC. Les lignées mutantes rapportées ont montré une teneur totale en gliadine réduite (en particulier les  $\alpha$ -gliadines), une teneur en gluténine augmentée (en particulier HMW) en raison d'un effet compensatoire et, par conséquent, un rapport gliadine / gluténine plus faible (Sanchez-León *et al.*, 2018).

### **Etape 3 :**

La confirmation de la teneur en  $\alpha$ -gliadine significativement réduite dans les lignées mutantes a été suivie d'une vérification portant sur la réduction de la réactivité immunitaire, pour laquelle les graines T2 ont été analysées avec des anticorps monoclonaux R5 et G12. Une réduction moyenne de plus de 60% de gluten total a été observée (Sanchez-León *et al.*, 2018).

### **Etape 4 :**

Enfin, la qualité boulangère des lignées mutantes a été évaluée à l'aide du test de sédimentation SDS. En utilisant de la farine produite à partir de graines T2 et T3 de plusieurs lignées mutantes sélectionnées en vrac. Les résultats du test de sédimentation SDS ont indiqués une qualité et des performances de panification raisonnablement bonnes pour des lignées éditées (Sanchez-León *et al.*, 2018).

Bien que cette pipeline ait identifié et caractérisé des mutations pour les gliadines, un certain nombre d'autres problèmes ont été mis en évidence :

(a) La mutagenèse CRISPR/Cas9 peut créer des mutations hors cible. En conséquence, Sanchez-León et ses collaborateurs ont effectué le séquençage Sanger des gènes clonés de  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\omega$ -gliadine et de l'ensemble du génome du blé (En portant une attention particulière aux loci des sites potentiellement hors cible) à partir de lignées mutantes et ont pu conclure que des mutations hors cible s'étaient produites. Cela a démontré la haute spécificité des sgRNA choisis (Sanchez-León *et al.*, 2018).

(b) Un autre problème concerne la transmission des mutations aux générations suivantes. Via les technologies RP-HPLC et Illumina, l'hérédité du profil des gliadines et des gluténines (phénotype de la prolamine) a été confirmée. Fait intéressant, la présence ou l'absence du vecteur d'expression Cas9 dans les plantes T2 n'a pas semblé affecter les fréquences de mutation par rapport aux plantes T0 d'origine (Sanchez-León *et al.*, 2018).

(c) Les approches PCR et Illumina ont également été utilisées pour tester si l'une des lignées de blé à faible teneur en gluten étaient exemptes de transgène et d'insertions au site de clivage. Trois lignées de blé tendre et six lignées de blé dur ont été identifiées comme étant sans transgène et sans insertion. Ces lignées étaient pleinement fertiles, généraient des graines et avaient un nombre de chromosomes normal (Sanchez-León *et al.*, 2018).

(d) Les lignées de blé à faible teneur en gluten et sans transgène qui en résultent peuvent fournir du matériel utile pour instaurer le caractère faible en gluten / faiblement immunogène dans les variétés de blé d'élite, ou pour entreprendre d'autres améliorations itératives par CRISPR / Cas9 (Sanchez-León *et al.*, 2018).

CRISPR / Cas9 peut être utilisé pour éliminer ou réduire la teneur de la fraction toxique du gluten. Sanchez-León et son équipe ont montré qu'une fréquence de mutation élevée a été obtenue à l'aide de CRISPR / Cas9 de la famille des gènes de la  $\alpha$ -gliadine qui se trouve dans le blé panifiable et le blé dur, donnant des lignées avec une immunoréactivité réduite jusqu'à 85 % par rapport à celle du type sauvage. Ces lignées de blé non-transgénique à faible teneur en gluten constituent la première étape du développement de lignées de blé totalement dépourvues de gènes de la gliadine (Sanchez-León *et al.*, 2018).

Le principal défi est désormais de tirer parti de tout le potentiel de la technologie CRISPR/Cas9 pour modifier précisément les gènes de la gliadine, en supprimant leur capacité immunogène tout en conservant leur fonctionnalité et leurs caractéristiques organoleptiques (García-Molina *et al.*, 2019).

Les éditeurs de base, qui sont composés d'un domaine désaminase et d'un variant Cas9 (nickase D10A (nCas9) ou Cas9 catalytiquement déficient (dCas9)) peuvent être utilisés pour introduire spécifiquement des mutations dans les épitopes CD (déterminant antigénique cœliaque disease), modifiant la composition en acides aminés de ces épitopes, et briser leur reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigène (García-Molina *et al.*, 2019).

L'efficacité de ces éditeurs de base a été grandement améliorée, et l'utilisation de différentes protéines Cas, comme Cpf1, étend également l'application de cette technologie aux régions riches en AT (García-Molina *et al.*, 2019).

### 3.3. Approche à cibles multiples $\alpha$ - et $\gamma$ -gliadine (Jouanin *et al.*, 2019)

Jouanin et ses collaborateurs ont élaboré une édition des  $\alpha$ - et  $\gamma$ -gliadines avec plusieurs ARNGs dans une seule construction.

Les  $\alpha$ -gliadines sont présentes sous forme de répétitions en tandem sur les chromosomes du groupe 6. Par conséquent, il est possible que la réparation des cassures double brin simultanées dans de telles régions puisse conduire non seulement à de petites délétions, mais également à un « abandon d'allèles » (Jouanin *et al.*, 2019).

Le pipeline optimisé pour le criblage des plantes produites comprend les étapes suivantes :

#### **Etape 1 :**

L'ADN est extrait des jeunes feuilles T1 et analysé par ddPCR pour les changements dans le nombre de copies du gène. L'approche ddPCR peut mesurer si les gènes de gliadine sont supprimés par rapport au nombre présent dans les plantes d'origine (Jouanin *et al.*, 2019).

#### **Etape 2 :**

Les protéines sont extraites de l'endosperme de graines T1 (prometteuses) sélectionnées pour une analyse Acid-PAGE afin de rechercher les changements correspondants dans les profils protéiques, c'est-à-dire les bandes de gliadine manquantes par rapport aux plantes d'origine (Jouanin *et al.*, 2019).

#### **Etape 3 :**

L'ADN des feuilles des meilleures lignées T1 candidates est ensuite analysé par GlutEnSeq. Les gènes du gluten ciblés sont séquencés et comparés aux gènes de gluten correspondants extraits de la variété d'origine. De cette façon, les changements dans la séquence d'ADN des gènes du gluten peuvent être identifiés (Jouanin *et al.*, 2019).

#### **Etape 4 :**

Les lignées de blé éditées les plus intéressantes de l'analyse GlutEnSeq sont auto-pollinisées et les graines T2 ou T3 résultantes sont analysées au niveau protéique par LC-MSMS (Jouanin *et al.*, 2019).

Une fois identifiées, les lignées modifiées génétiquement qui sont complémentaires sur la base des types et du nombre d'épitopes immunogènes cœliaques éliminés ou inactivés qu'elles portent, peuvent être croisées pour combiner les gliadines modifiées génétiquement. La descendance doit également être criblée pour sélectionner contre l'hérédité de la construction CRISPR/Cas9 (Jouanin *et al.*, 2019).

Les lignées avec plusieurs gliadines génétiquement modifiées nécessitent une analyse protéomique avancée, suivis d'essais immunologiques dans lesquels la farine des nouvelles lignées de blé mutantes d'épitopes serait criblée avec des panels de clones de cellules T pour tester une réaction CD-hypoimmunogène (Jouanin *et al.*, 2019).

Le système d'édition de gènes CRISPR/Cas9 récemment développé a le potentiel de modifier simultanément et avec précision plusieurs épitopes codés par la gliadine et/ou de supprimer certains des gènes, tout en maintenant potentiellement la qualité technologique alimentaire des protéines de la gliadine (Jouanin *et al.*, 2019).

Dans l'édition de gènes CRISPR/Cas9, un seul ARN guide (sgRNA) dirige l'endonucléase Cas9 vers les sites d'ADN cibles où elle crée une cassure double brin. Pendant la réparation, le mécanisme inné (de réparation) de l'ADN de la plante peut générer des erreurs, entraînant généralement de petites délétions d'un ou de quelques nucléotides. Dans le cas des gènes de la gliadine répétés en tandem dans le blé, des cassures double brin simultanées peuvent se produire dans des gènes consécutifs, ce qui peut entraîner la suppression de gros fragments d'ADN portant un ou plusieurs gènes de la gliadine (Jouanin *et al.*, 2019).

# *Conclusion*

## Conclusion

La maladie cœliaque est considérée comme l'une des maladies gastro-intestinales qui a vu une large expansion dans les dernières années. Son étiologie semble être en relation avec certains facteurs de risque (durée de l'allaitement maternel, date de l'introduction de gluten et les prédispositions génétiques).

Cette pathologie est une entéropathie sensible au gluten qui correspond à une réponse immunitaire disproportionnée aux protéines de ce dernier pouvant se traduire sur le plan histologique par une anomalie qui peut aller d'une discrète lymphocytose intra épithéliale à une atrophie villositaire totale.

Jusqu'à ce jour la maladie cœliaque ne semble pas avoir encore livré tous ses secrets. Mais, ce qui est sûr c'est que le régime sans gluten reste le seul traitement actuel avec toutes ses difficultés, ses contraintes au quotidien à la fois pour le patient mais aussi pour son entourage qui peut se sentir démuni face à sa difficulté et son impact sur la qualité de vie.

Les expérimentations faites par le biais de CRISPR/Cas9 ont donné des résultats promoteurs, ce qui a donné un lieu d'espoir pour les patients cœliaques.

La prochaine génération d'outils CRISPR en cours de développement pour l'agriculture va au-delà de l'édition basée sur DSB en tirant parti de la capacité des systèmes CRISPR à cibler spécifiquement les séquences d'ADN.

Après la désactivation des domaines de nucléase Cas9 et Cpf1, qui sont distincts des domaines de reconnaissance d'ADN, ces protéines de ciblage d'ADN peuvent être fusionnées avec diverses activités enzymatiques.

Par exemple, la fusion d'une désaminase à Cas9 désactivé permet la conversion directe d'un seul nucléotide d'ADN en un autre indépendamment de la formation de DSB. Les versions actuelles d'une telle édition de base sont limitées aux conversions C-à-T ou A-à-G et à des fenêtres d'édition de séquence étroites.

Ces limitations seront probablement surmontées d'ici un an à mesure que les recherches sur l'édition de base s'intensifieront. Nous pouvons nous attendre à une suite encore plus large d'outils CRISPR dans un avenir proche, car Cas9 et Cpf1 désactivés sont en outre utilisés pour visualiser des loci génomiques spécifiques, pour réguler directement la transcription des gènes et pour induire des modifications épigénétiques ciblées.

## *Liste des références bibliographiques*

## Liste des références bibliographiques :

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). (2012). Allergie. [En ligne], disponible sur : <https://ansm.sante.fr/>

Amrouche, (2012). Du blé au pain. *Génie Alimentaire*. [En ligne], disponible sur : <https://genie-alimentaire.com/spip.php?auteur1>

Baptiste, J. (2017). CRISPR/Cas9: histoire, méthode, potentiel & impact. Thèse en pharmacie, Université Toulouse III. Paul Sabatier.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provide acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science, Mar, 315*(5819), 1709-1712.

Bellaïche, M. (2018). Maladie cœliaque. *iKB ECN Pédiatrie, 10*, 103.

Belleannée, G. (2018). Maladie cœliaque. [En ligne], disponible sur : <https://www.snfge.org/content/maladie-coeliaque>

Bietz, J. A., & Huebner, F. R. (1980). Structure of glutenin: achievements at the Northern Regional Research Center. *Ann, Technol, Agric, 29*(2), 249-277.

Bonjean, A. P., & Angus, W.J. (2001). The world wheat book: A history of wheat breeding. *Annals of Botany, 88*(5), 953-955.

Boudraa, G., Bessahraoui, M., Nadjadi, K. B., & Niar, S. (2008). Epidémiologie - Evolution de l'incidence de la maladie cœliaque chez l'enfant de l'Est Algérien (1975-2007). *Archives de Pédiatrie, 15*, 949.

Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmunity reviews, 7*, 644-650.

Caminero, A., Herrán, A., Nistal, E., Pérez-Andrés, J., Vaquero, L., *et al.*, (2014). Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: Isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiology Ecology, 88*(2), 309-319.

- Catassi, C., & Lionetti, E. (2015). Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. *Digestive and Liver Disease*, 46(12), 1057-1063.
- Catassi, C., Bearzi, I., & Holmes, G. K. (2005). Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology*, 128, 79-86.
- Cegarra, M. (2006). Le régime sans gluten: difficultés du suivi. *Archives de pédiatrie*, 13, 576-578.
- Charvet, J. P. (2018). Atlas de l'agriculture. Mieux nourrir le monde. *Autrement*, 56, 96.
- Chen, Y. S., Christensen, J. E., Broadbent, J. R., Steele, J. L. (2003). Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl, Environ, Microbiol*, 69, 1276-1282.
- Cilleruelo-María, L., Fernández-Fernández, S., Jiménez-Jiménez, J., Rayo, A., & Larramendi, C. (2016). Prevalence and natural history of celiac disease in a cohort of at-risk children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 62, 739-745.
- Clot, F., Babron, M. C., & Clerget-Darpoux, F. (2001). La génétique de la maladie cœliaque. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 4, 263-267.
- Cornec, M., Lefebvre, J., & Marchylo, B. (1994). Influence of high Mr glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of glutes and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat Sicco. *Journal of Cereal Science*, 19, 231- 241.
- Debiton, C. (2010). Identification des critères du grain de blé (*Triticumaestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniqueswaxy. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- De-Boissieu, D., & Dupont, C. (2009). Allergie au blé et maladie cœliaque : comment faire la différence ? *Arch Pediatr*, 16, 873-875.
- Denery-Papini, S., Popineau, Y., & Gueguen, J. (2001). Implication des protéines de céréales dans la maladie cœliaque, 36, 43-51.

D'Ovidio, R., & Masci, S. (2004). Les sous-unités de gluténine de bas poids moléculaire du gluten de blé. *J Cereal Sci*, 39, 321-339.

Dube, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garrity, C., *et al.* (2005). The prevalence of celiac disease in average risk and at-risk western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*, 128, 57-67.

Dubreil, L., Compoin, J. P., & Marion, D. (1997). Interaction of Puroindolines with Wheat Flour Polar Lipids Determines Their Foaming Properties. *ACS Publications*, 45(1), 108-116.

F.A.O. (2009). Perspectives des récoltes et situation alimentaire, 01, 44.

F.A.O. (2015). Profil de Pays – Algérie. [En ligne], disponible sur : <http://www.fao.org/3/i9861fr/I9861FR.pdf>

Farrell, R. J., & Kelly, C. P. (2002). Celiac sprue. *New England Journal of Medicine*, 346(3), 180-188.

Fasano, A., & Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120, 636-51.

García-Molina, L., Lewis-Mikhael, A. M., Riquelme-Gallego, B., Cano-Ibáñez, N., Oliveras-López, M. J., & Bueno-Cavanillas, A. (2020). Improving type 2 diabetes mellitus glycaemic control through lifestyle modification implementing diet intervention: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*, 59(4),1313-1328.

García-Molina, M. D., Giménez, M. J., Sánchez-León, S., Barro, F. (2019). Gluten Free Wheat: Are We There? *Nutriments*, 11(3), 487.

Gargouri, L., Kolsi, N., Maalej, B., Well, M., & Mahfoudh, A. (2017). Maladie Coeliaque chez l'enfant. 20, 20-28.

Gass, J., Ehren, J., Strohmeier, G., Isaacs, I. (2005). Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for celiac sprue therapy. *Biotechnol. Bioeng*, 92, 674-684.

Gilbert, W., & Maxam, A. (1973). The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc Natl AcadSci U S A*, 70, 3581-3584.

- Godat, S., Velin, D., Aubert, V., Nydegger, A., Schoepfer, A., & Maillard, M. (2013). Maladie cœliaque: état des lieux. *Revu Med Suisse*, 9, 1584-1589.
- Green, P. H. R., Lebowitz, B., & Greywoods, R. (2015). Celiac disease. *Clinical reviews in allergy and immunology*, 135(5), 1099-1106.
- Grogna, P. (2016). Transformation des céréales. *Itinéraires BIO*, 26, 7-9
- Gujral, N., Freeman, H., & Thomson, A., (2012). Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18, 6036.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol, Gastrointest, Liver Physiol*, 283, 996-1003.
- Hawkins, J. M., Archer, K. J., Strakowski, S. M., & Keck, P. E. (1995). Somatic treatment of catatonia. *Int J Psychiatry Med*, 25(4), 345-69.
- Hegde, A. (2008). Protéolyse et plasticité synaptique. *Apprendre et mémoire : Une référence complète*, 525-545.
- Helmerhorst, E. J., Zamakhchari, M., Schuppan, D., Oppenheim, F. G. (2010). Discovery of a novel and rich source of gluten-degrading microbial enzymes in the oral cavity. *PloS one*, 5, 132-164.
- Igrejas, G., Gaborit, T., Oury, F., Chiron, H., Marion, D., & Branlard, G. (2001). Genetic and Environmental Effects on Puroindoline-a and Puroindoline-b Content and their Relationship to Technological Properties in French Bread Wheats. *Journal of Cereal Science*, 34(1), 37-47.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. A. (2012). Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-21.
- Johannes, B. E., Satoshi, M., Fei, W., Mizuki, T., & Frank, G. (2016). Celiac disease. *Journal of the American Chemical Society*, 138(34), 10718-10721.
- Jouanin, A., Gilissen, L.J.W.J., Schaart, J. G., Leigh, F. J., Cockram, J., Wallington, E. J., Boyd, L. A., *et al.* (2020). CRISPR/Cas9 Gene Editing of Gluten in Wheat to Reduce Gluten Content and Exposure-Reviewing Methods to Screen for Coeliac Safety. *Front Nutr*, 24, 7-51.

Jouanin, A., Schart, J.G., Boyd, L.A., Cockram, J., Leigh, F.J., Bates, R., Wallington, E.J., Visser, R.J., Smulders, M.J. (2019). Development of the GlutEnSeq capture system for sequencing gluten gene families in hexaploid bread wheat with deletions or mutations induced by  $\gamma$ -irradiation or CRISPR/Cas9. *Journal of Cereal Science*, 88, 157-166.

Kagnoff, M. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of clinical investigation*, 117, 41-49.

Khater, S., & Cellier, C. (2018). Hypersensibilité au gluten non cœliaque. *John Libbey Eurotext*, 25(8), 787-790.

Lamireau, T., & Clouzeau, H. (2013). Épidémiologie de la maladie cœliaque. *Pathologie Biologie*, 61, 14.

Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Laurila, K., Collin, P., Rissanen, H., *et al.* (2007). Increasing prevalence of celiac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*, 26(12), 17-25.

Lopez, P. (2014). Maladie cœliaque, épilepsie et calcifications intra crâniennes. [En ligne], disponible sur : <https://slideplayer.fr/slide/180185/?fbclid=IwAR00-SEkobIXKi83pdPQm3esqGolywmOm9kF39EqljMsXIZ82Tj6l65juI>

Loponen, J. (2006). Prolamin degradation in sourdoughs. Thesis. University Helsinki.

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., *et al.* (2013). The Oslo definitions for celiac disease and related terms. *Gut*, 62, 43-52.

Malamut, G. (2012). La maladie cœliaque. *Médecine Nutr*, 48, 24-27.

Malamut, G., & Cellier, C. (2010). Maladie cœliaque de l'adulte. *Revue Française d'Allergologie*, 50, 254-259.

Malhet, B. (2016). Edition du génome et retouche génétique par le système CRISPR/Cas9. [En ligne], disponible sur : <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-edition-genome-retouche-genetique-crispr-cas9/>

Matysiak-Budnik, T., Jamet, P., Fabiani, B., Nion-Larmurier, I., Marjanovic, Z., & Ruskoné-Fourmestreaux, A. (2013). Primary intestinal B-cell lymphoma: a prospective multicentre clinical study of 91 cases. *Dig Liver Dis*, 45, 947-952.

Mazoyer, M. (2002). Une situation agricole mondiale insoutenable, ses causes et les moyens d'y remédier. *Mondes en développement*, 117, 25-37.

Messer, M., Anderson, C. M., Hubbard, L. (1964). Studies on the mechanism of destruction of toxic action of wheat gluten in celiac disease by crude papain. *Gut*, 5, 295-303.

Mosiniak, M., Prat, R., & Roland, J. C. (2006). Du blé au pain. *Planet vie*, 575, 23.

Mouterde, O., Hariz, M., & Dumant, C. (2008). Le nouveau visage de la maladie cœliaque. *Archives de Pédiatrie*, 15, 501-503.

Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K., & Scharf, S. J. (1987). Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. *Unites States*, 42(7), 673-676.

Niewinsky, M. S., & MARY, M. (2008). Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc*, 108, 661-672.

Nion-Larmurier, I., & Cosnes, J. (2009). Maladie cœliaque, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 33, 508-517.

Pallos, F. M., Robertson, G. H., Pavlath, A. E., & Orts, W. J. (2006). Thermoformed wheat gluten biopolymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 349-352.

Pincemaille, J. (2018). Interactions et assemblages de prolamines du blé. Ingénierie des aliments. Université Montpellier.

Pinkhasov, R., Wong, J., Kashanian, J., Lee, M., Samadi, D., Pinkhasov, M., & Shabsigh, R. (2010). Are men short changed on health? Perspective on health care utilization and health risk behavior in men and women in the United States. *International journal of clinical practice*, 64, 475-487.

Piper, J. L., Gray, G. M., Khosla, C. (2004). Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol. Exp. Ther*, 311, 213-219.

Polenko, I., Biemond, I., Van-Leewen, A., Schreuder, I., Khan, P. M., Guerrero, J., & D'Amaro, J. (1981). Gluten sensitive enteropathy in Spain: Genetic and environmental factors. *In The genetics of coeliac disease, McConnel*, 211-231.

Pomeranz, Y. (2016). Wheat Chemistry and Technology. *American Journal of Food Science and Technology*, 5(4), 135-140.

Pyle, S. A., Haddock, C. K., Hymowitz, N., Schwab, J., & Meshberg, S. (2005). Family Rules About Exposure to Environmental Tobacco Smoke. *Families, Systems, & Health*, 23(1), 3-16.

Rewers, M. (2005). Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease. *Gastroenterology*, 128, 47-51.

Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C.V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., Barro, F. (2018). Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J, Apr*, 16(4), 902-910.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., & Hutchison, C. A. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 687-695.

Schmitz, J. (2007). Le régime sans gluten chez l'enfant. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 20, 337-344.

Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, 2275-2279.

Shino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169, 5429-5433.

Socha, P., Mickowska, B., Urminská, D., Kacmarova, K. (2015). The use of different proteases to hydrolyze gliadins. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 101.

Stassi, F. (2020). La production mondiale de cereals atteindrait un nouveau record en 2020-2021. L'usine nouvelle. [En ligne], disponible sur : <https://www.usinenouvelle.com/article/la-production-mondiale-de-cereales-atteindrait-un-nouveau-record-en-2020-2021.N968561>

- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., & Moester, M. (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol. Gastro intest, Liver Physio*, 291, 621-629.
- Surget, A., Barron, C. (2005). Histologie du grain de blé. *Industrie des céréales*, 145, 3-7.
- Tagzout, D. (2017). Profil de La maladie Cœliaque de l'adulte. Thèse de doctorat d'état, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 299.
- Tatham, A. S., Drake, A. F., & Shewry, P. R. (1985). Une étude conformationnelle d'une protéine de graine de céréale riche en glutamine et en proline, la C hordéine. *Biochem J*, 226(2), 557-562.
- Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L. A., Lee, A. R., & Sharrett, M. K. (2005). Gluten-free diet survey: Are Americans with celiac disease consuming recommended amounts of fiber, iron, calcium and grain foods? *J. Hum. Médecine Nutr. Diet*, 18, 163-169.
- Tkoub, E. (2008). Maladie cœliaque de l'adulte. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 48, 27-31.
- Varshavsky, A. (2001). Protéolyse. *Encyclopédie de la génétique*, 1573-1575.
- Wei, G., Tian, N., Valery, A. C., Zhong, Y. (2015). Identification of pseudolysin (lasB) as an aciduric gluten-degrading enzyme with high therapeutic potential for celiac disease, *110*, 899-908.
- Wolf, C., Siegel, J. B., Tinberg, C., Camarca, A. (2015). Engineering of Kuma030: a gliadin peptidase that rapidly degrades immunogenic gliadin peptides in gastric conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 137, 13106-13113.
- Wrigley, C.W., Day, L., Augustin, M. A., Batey, I.L. (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 82-90.
- Zakharova, M. Y., Belyanina, T. A., Sokolov, A. V., Kiselev, I. S., & Mamedov, A. E. (2019). The Contribution of Major Histocompatibility Complex Class II Genes to an Association with Autoimmune Diseases. *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*, 11(4), 4-12.

## NOUVELLES TECHNOLOGIES POUR L'ACQUISITION D'UN BLÉ SANS GLUTEN : UN ESPOIR POUR LES CÉLIAQUES

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et  
Génomique Végétale

### Résumé :

Le blé et ses produits dérivés constituent depuis longtemps la base de notre alimentation. C'est aussi la seule céréale donnant une farine panifiable grâce à la nature unique de ses protéines de réserve qui permettent la formation du réseau de gluten. Ce sont elles qui permettent, après hydratation, l'obtention d'une pâte souple et élastique, indispensable à la panification. Les effets de ces protéines sur la santé de l'être humain sont aujourd'hui au cœur de diverses questions. L'ingestion de gluten chez des sujets dits cœliaques, génère une réaction immunitaire anormale qui entraîne une atrophie des villosités débutant dans la partie proximale de l'intestin grêle et pouvant s'étendre à son ensemble. L'approche thérapeutique adoptée jusque-là consiste à bannir le gluten du régime alimentaire du patient. Afin de palier à l'aspect contraignant de cette approche des stratégies alternatives ont vu le jour. La dégradation enzymatique du gluten comme première approche, abolissant les activités immunogènes et toxigènes de ces protéines. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à trois méthodes essentielles de protéolyse. La seconde stratégie consiste en la technologie CRISPR/Cas9 utilisée afin de réduire la quantité des  $\alpha$ -gliadines dans le grain de blé, fournissant ainsi des lignées avec une immuno-réactivité réduite.

**Mots clés :** Blé, gluten, cœliaque, dégradation enzymatique, protéolyse, CRISPR/Cas9, gliadine.

**Laboratoire de recherche :** Biotechnologie et Génomique Végétale

Jury d'évaluation :

**Président :** *Mr TEMAGOULT Mahmoud* (MAA - UFM Constantine),

**Encadrante :** *Melle HAMLIA Chourouk* (MCB - UFM Constantine),

**Examinatrice :** *Mme BENABDOUN Faïza Meriem* (MCB - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 08/07/2021