UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE NANCY HENRI POINCARE I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT

Thèse de Doctorat en Sciences

Discipline ARN : Biogénèse et Structure/Fonction

Martine, Dominique, Joëlle MORISSET

EVALUATION de L'ALLERGENICITE des ALIMENTS

APPLICATION au DIAGNOSTIC de L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

Thèse dirigée par le Pr Denise-Anne MONERET-VAUTRIN

Soutenue le 22avril 2008

Jury :

Pr Thomas BIEBER

Pr Christophe DUPONT

Pr Gisèle KANNY

Pr Hervé LEVESQUE

Pr Luc MEJEAN

Pr Denise-Anne MONERET-VAUTRIN

Pr Pierre ROUGE

Dr Bernard E. BIHAIN

Evaluation de l'allergénicité des aliments.
Application au diagnostic de l'allergie alimentaire

Résumé :

Cette thèse actualise les connaissances de l'évaluation de l'allergénicité des aliments et son application au diagnostic de l'allergie alimentaire.
Après la définition, les caractéristiques et la classification des allergènes alimentaires, les phénomènes physico-chimiques modifiant l'allergénicité des aliments ainsi que les réactivités croisées sont décrites.
Ainsi sont introduits les outils cliniques et biologiques utiles au diagnostic de l'allergie alimentaire et à la détection des traces d'allergènes alimentaires.
Une collaboration étroite entre cliniciens et chercheurs biologistes, permet d'optimiser la prise en charge diagnostique et thérapeutique de l'allergie alimentaire.
Cette démarche se concrétise par la mise à disposition et l'utilisation de divers outils (développement d'allergènes recombinants, dosage de contaminants alimentaires dans des médicaments ou aliments, ...) et est illustrée par diverses mises en situation clinique réelle.

Mots clefs : **Allergie alimentaire. Allergènes alimentaires. Diagnostic. Allergènes recombinants. Détection des allergènes. Seuil de réactivité**.

Evaluation of Food allergenicity.
Application to the diagnosis of food allergy

Abstract:
The aim of this thesis consists in reviewing the advanced knowledge about the evaluation of food allergenicity and the different applications to the diagnosis of food allergy. Definition, characteristics and classification of food allergens precede the description of physical and chemical factors involved in the modification and cross-reactivity of food allergens. This review leads to the current tools used for the in vivo and in vitro diagnosis of food allergy as well as the recent procedures which have been developed for the detection of allergen traces in industrial food.
A close collaboration between clinicians and biologists improves the diagnosis procedures. This cooperation is illustrated by various clinical situations in which new tools (i.e. specific IgE to recombinant allergens, food allergen traces identification in meals or drugs) have improved the diagnostic procedures and the consequent therapeutic measures.

Key words: **Food allergy- Food allergens- Diagnosis- Recombinant allergens- Allergen detection- Threshold of reactivity.**

La thèse a été préparée dans l'unité de recherche ***EA 3999 Maladies allergiques: Diagnostic et thérapeutique***, au sein du service de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie, le laboratoire MTM**,** 15 rue du bois de la champelle 54500 Vandoeuvre Les Nancy France et du laboratoire du Jaffe Institute for Food Allergy au sein du département de Pediatric Allergy and Immunology au Mount Sinai School of Medicine à New York, durant l'année de mobilité aux USA.

Sommaire

EVALUATION de l'ALLERGENICITE des ALIMENTS.
APPLICATION au DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE.

PLAN DE THESE

	Page
Résumé	**2**
Glossaire	**7**
INTRODUCTION	
I ASPECTS CLINIQUES de L'ALLERGIE ALIMENTAIRE: METHODES DIAGNOSTIQUES CLINIQUES	**10**
I-1 Tableaux cliniques de l'allergie alimentaire	**10**
I-2 Moyens cliniques du diagnostic de l'allergie alimentaire	**12**
I -2-1 Premières données de l'interrogatoire et de l'examen clinique	**12**
I-A-2-1-a. Interrogatoire	12
I-A-2-1-b. Enquête alimentaire	13
I-A-2-1-c. Examen Clinique	13
I-2-2 Tests cutanés	**14**
I-A-2-2-a. Les prick-tests	14
I-A-2-2-b. les atopy patch tests	14
I-A-2-3 Epreuves d'éviction	**15**
I-A-2-4 Tests de provocation	**15**
II DEFINITION et CARACTERISTIQUES des ALLERGENES ALIMENTAIRES	**16**
II-1 Définition d'un allergène alimentaire	**16**
II-2 Influence des conditions physico-chimiques sur l'allergénicité des protéines alimentaires	**18**
II-2-1 Protéolyse digestive	**19**
II-2-2 Influence de la température	**20**
II-2-3 Autres facteurs modifiant l'allergénicité des protéines	**22**
III EXTRACTION DES ALLERGENES	**23**
III-1 Principes de la production d'extraits allergéniques	

III-2 Synthèse des allergènes recombinants 26

IV DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE 28

IV-1 Mesure de la réaction IgE-dépendante spécifique de l'allergène 28

IV-1-1 Tests biologiques d'identification unitaire d'IgE spécifiques 28

IV-1-1-a. Quantification des IgE spécifiques vis-à-vis d'extraits allergéniques conventionnels 28

IV-1-1-b. Quantification des IgE spécifiques pour des protéines naturelles purifiées et recombinantes 29

IV-1-2 Analyse immunologiques qualitatives des IgE spécifiques 31

IV-1-2-a. Immuno-empreintes 31

IV-1-2-b. Iso-électrofocalisation 32

IV-1-2-c. Peptides microarrays 33

IV-2 Méthodes basées sur la détection d'une activation cellulaire en présence de l'allergène 35

IV-2-1 Histaminolibération leucocytaire (HLL) 35

IV-2-2 Mesure de l'activation des basophiles en cytométrie de flux 36

IV-2-3 CAST 37

IV-2-4 Tests d'activation lymphocytaire 37

V IDENTIFICATION et QUANTIFICATION des ALLERGENES: application à la détection des traces. 39

V-1 Généralités 39

V-2 Méthodes de détection et quantification des traces d'allergènes dans les aliments 41

V 2-2 Analyses biochimiques conventionnelles 42

V-2-2-a. RAST/EAST inhibition 43

V-2-2-b. SDS-PAGE/ immunoblot 43

V-2-2-c. Etude fonctionnelle cellulaire par mesure des médiateurs 43

V-2-2-d. Immunoélectrophorèse en roquette ou RIE 44

V-2-2-e. Le Dot Blot (Dot immunoblotting) 44

V-2-2-f. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 44

V-2-2-g. La méthode PCR ou réaction en chaîne par polymérase 45

V-2-2-h. Les biosenseurs 47

TRAVAIL PERSONNEL 48

I MATERIEL ET METHODES 49

I-1 Détermination des seuils de réactivité aux aliments : LOAEL et NOAEL à l'arachide. 49

I-2 Synthèse d'allergènes recombinants: implications 51

dans le diagnostic de l'allergie à l'arachide.	
I-3 Détection d'allergènes dans les aliments	**52**
I-3-1 Détection de protéines de lait de vache (PLV) dans un biscuit diététique garanti sans lait.	**52**
I-3-2 Détection de traces de PLV dans les probiotiques	**55**
I-3-3 Détection de PLV dans le lactose	**55**
I-3-4 Détection de protéines de soja dans une formule infantile à base d'acides aminés	**58**
II RESULTATS	**63**
II-1 Détermination des seuils de réactivité aux aliments : LOAEL et NOAEL dans l'allergie à l'arachide	**63**
II-2 Synthèse d'allergènes recombinants: implications dans le diagnostic de l'allergie à l'arachide.	**67**
II-3 Détection d'allergènes dans les aliments	**67**
II-3-1 Détection de PLV dans un biscuit diététique garanti sans lait.	**67**
II-3-2 Détection de traces de PLV dans les probiotiques	**75**
II-3-3 Détection de PLV dans le lactose	**75**
II-3-4 Détection de protéines de soja dans une formule infantile à base d'acides aminés	**77**
III DISCUSSION	**83**
III-1 Détermination des seuils de réactivité aux aliments : LOAEL et NOAEL dans l'allergie à l'arachide	**83**
III-2 Synthèse d'allergènes recombinants: implications dans le diagnostic de l'allergie à l'arachide.	**86**
III-3 Détection d'allergènes dans les aliments	**86**
III-3-1 Detection de PLV dans un biscuit diététique garanti sans lait.	**86**
III-3-2 Détection de PLV dans les probiotiques	**88**

III-3-3 Détection de PLV dans le lactose	**89**
III-3-4 Détection de protéines de soja dans une formule infantile à base d'acides aminés	**91**
CONCLUSIONS	**95**
Références	**98**
ANNEXES	**144**
Annexe 1	144
Annexe 2	145
Annexe 3	150
Annexe 4	157
Annexe 5	161
Annexe 6	171
Annexe 7	174
Annexe 8	177
Annexe 9	179
Annexe 10	181
Annexe 11	184
Annexe 12	189

Glossaire

AA : allergie alimentaire
Aa : acides aminés
Ac : anticorps
Ag : antigène
APLV : allergie aux protéines de lait de vache
APT : atopy patch test
CA : choc anaphylactique
DBPCFC : double blind placebo control challenge ou test de provocation orale en double aveugle versus placebo
EAST : enzyme allergosorbent test
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
HLL : histamino-liberation leucocytaire
IDR : intradermoréaction
IgE : immunoglobuline E
IgG : immunoglobuline G
LV : lait de vache
LOAEL: lowest observed adverse effect level
Ly : lymphocyte
NOAEL : non observed adverse effect level
PCR : polymerase chain reaction
PLV: protéines de lait de vache
PMA :protein microarray(s)
PR: protein(s) recombinante(s)
PT: prick-tests
RAST : radio-allergosorbent test
RIE : rocket immuno-electrophoresis
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulphate polyacryl gel electrophoresis
TC : tests cutanés
TPL : test de provocation labiale
TPO : test de provocation orale

EVALUATION de L'ALLERGENICITE des ALIMENTS

APPLICATION au DIAGNOSTIC de L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

INTRODUCTION

Les maladies atopiques, affection du système immunitaire dont la prévalence a explosé à la fin du XXème, doivent être non seulement connues des Allergologues et des Immunologistes, mais aussi de l'Interniste, car il s'agit d'une maladie de système à part entière, comme en témoigne l'intérêt qu'y portent les autres spécialités médicales : Pédiatrie, Dermatologie, Pneumologie, ORL, Gastro-entérologie, Médecine Environnementale ….
Les maladies atopiques se caractérisent par une propension anormale, du système immunitaire à synthétiser des IgE spécifiques en réponse à une exposition à des allergènes naturels pénétrant par les voies naturelles. Coca et Cooke ont été les premiers à introduire le terme d'atopie qui décrivait à l'époque une prédisposition familiale à développer des manifestations allergiques courantes de type immédiate vis a vis d'allergènes courants au contact des muqueuses respiratoires ou du tractus digestif (Coca AF et al. *J Immunol* 1923).

Les manifestations cliniques les plus courantes : dermatite atopique, asthme et rhino-conjonctive allergique se caractérisent par une prédisposition familiale importante, les facteurs génétiques actuellement impliqués étant multiples et complexes.

L'allergie alimentaire appartient à cette catégorie d'affection car elle est le résultat d'une anormale réaction spécifique du système immunitaire vis-à-vis d'un antigène naturel (Ag) sous l'interaction de l'environnement et d'un terrain génétique particulier. Néanmoins, si l'allergie immédiate IgE-médiée est le mécanisme classiquement évoqué -et probablement aussi le mieux connu- dans l'allergie alimentaire, d'autres mécanismes sont également incriminés où la participation d'acteurs cellulaires en première ligne, tels que les lymphocytes T, est primordiale.
L'allergie alimentaire (AA), sujet quasi anecdotique il y a 30 ans, a pris une place importante non seulement en santé publique mais aussi dans le monde de l'industrie agro-alimentaire. La prévalence des AA tout comme celles des maladies allergiques a en effet cru ces dernières années, en particulier dans les pays industrialisés occidentaux (Madsen C. et al. *Proc Nutr Soc*. 2005; Moneret-Vautrin DA, et al. *Allergy* 2005). La prévalence des AA tout comme celles des maladies allergiques a cru ces 20 dernières années, en particulier dans les pays industrialisés occidentaux. L'AA confirmée par test de provocation concernerait 4 à 8% des enfants (Bock SA, *Pediatrics* 1987; Roehr CC, *Clin Exp Allergy* 2004). Une étude menée chez 33110 sujets de moins de 61 ans représentant la France à une échelle au 1/1000 a été menée de 1997 à 1998 ; elle a montré que 3,24 % de la population française en dessous de 61 ans rapportait des manifestations compatibles avec une AA (Kanny G, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2001).
Les méthodes de préparation des aliments, l'application précoce sur la peau de topiques contenant de l'huile d'arachide ont été notamment incriminés dans l'accroissement de l'allergie à l'arachide (Beyer K, et al. *J Allergy Clin. Immunol* 2001; Kagan RS et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003; Lack G, et al. *N Engl J Med* 2003; Maleki SJ, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003).
La généralisation de l'usage de certains traitements comme les antiacides (Untersmayr E et al., *FASEB J* 2005; Untersmayr E et al., *J Allergy Clin Immunol* 2003), le rôle de la pollution intérieure, le mode de vie citadin avec une moindre exposition aux endotoxines, la sélection d'espèces végétales ou les traitements subis par les plantes, contribuant à augmenter leur teneur en protéines de stress, ont également été évoqués (Diez U, LARS-study. *Int J Hyg Environ Health*. 2000; Kulig M, et al., *Allergy* 1999; Floistrup H, et al., *J Allergy Clin Immunol* 2006; Ebner C et al., *Allergy* 2001; Armentia A, et al., *Allergol Immunopathol* 2003).

Du fait de l'implication croissante de l'AA dans les anaphylaxies graves voire létales (Moneret-Vautrin DA, et al., *Allergy* 2005), des mesures législatives ont été prises afin d'obtenir un étiquetage adéquat de la présence des principaux allergènes dans les produits alimentaires industriels (Directive 2003/89/CE du Parlement Européen et du Conseil du 10 novembre 2003 modifiant la directive 2000/13/CE).
Divers kits ont été commercialisés ou en cours de développement afin de détecter une contamination des produits alimentaires par divers allergènes (Whitaker TB, *J AOAC Int*. 2005; Ben Rejeb S, *Food Addit Contam* 2005; Weber D, *J Agric Food Chem* 2006).
L'implication des industriels concernant la sécurité alimentaire a été un des moteurs du développement de la recherche et les progrès dans le diagnostic et la prise en charge de l'AA viennent en partie de la biotechnologie agro-alimentaire. Cette interdépendance entre médecine et industrie agro-alimentaire n'est pas nouvelle, Pasteur ayant achevé ses travaux sur la fermentation de l'orge et les procédés de pasteurisation, sous le mécénat de brasseurs lorrains (brasserie Tourtel) (Pasteur L. *1875. Études sur la bière et les conseils aux brasseurs*.).

L'objectif de cette thèse est de faire le point sur les outils actuels mis à la disposition des cliniciens dans le diagnostic de l'allergie alimentaire en 2008. Après avoir détaillé les différents moyens diagnostiques, leur utilisation pratique sera illustrée par divers problèmes cliniques en allergie alimentaire et les solutions apportées par ces différentes techniques. Ces différentes situations cliniques ont fait l'objet de publications antérieures ou sont en cours de soumission.

I ASPECTS CLINIQUES de L'ALLERGIE ALIMENTAIRE: METHODES DIAGNOSTIQUES CLINIQUES

I-1 Tableaux cliniques de l'allergie alimentaire

Le terme d'allergie alimentaire (AA) regroupe l'ensemble des réactions immuno-allergiques vis à vis d'un antigène d'origine alimentaire et ayant des conséquences néfastes sur l'organisme. L'AA implique le plus souvent un mécanisme d'hypersensibilité IgE dépendante. D'autres mécanismes peuvent être en cause, notamment dans certaines allergies aux protéines de lait de vache (APLV), se traduisant par un eczéma, des signes digestifs ou plus exceptionnellement par une hémosidérose pulmonaire ou syndrome de Heiner (Lee et al. *Adv Pediatr* 1978). L'émergence de ces manifestations implique une défaillance du processus physiologique de tolérance des antigènes alimentaires au sein du GALT (système immunitaire associé aux muqueuses du tractus digestif). S'il est relativement aisé de distinguer une AA d'une pathologie alimentaire quantitative (carences, obésité…), dans le domaine des affections alimentaires qualitatives, un mécanisme immuno-allergique doit être distingué de phénomènes toxiques (ex : intoxication scombroïde et allergie au poisson (Ohnuma et al. *Intern Med* 2001), d'intolérances alimentaires par déficit enzymatique (ex : APLV et intolérance au lactose) ou de fausses allergies alimentaires par perturbation du métabolisme des amines biogènes (ex : urticaire aux fraises).
Les principaux organes cibles de l'allergie alimentaire sont la peau, le tractus digestif et les voies respiratoires. Si le choc anaphylactique représente la forme d'allergie la plus grave, un œdème laryngé ou un asthme aigu grave peuvent être aussi l'expression d'une AA et engager également le pronostic vital immédiat.

Depuis plus d'une dizaine d'années, on observe une augmentation de la prévalence de l'AA dans les pays industrialisés. En France, sa prévalence est estimée à 3,24% en France (Kanny et al. *J Allergy Clin Immunol* 2001). L'AA est la 1ère cause des chocs anaphylactiques (CA) aux USA. En France, l'incidence des anaphylaxies alimentaires graves est probablement sous-estimée. Sur 794 CA admis aux urgences dans divers hôpitaux français, l'AA était impliquée dans « seulement » 10.2% des cas (Moneret-Vautrin et al. *Bull Acad Natl Med* 1995).
La banque de données du CICBAA (Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergie Alimentaire) a pu colliger de nombreuses observations d'AA avérées. Ces données confirment que la **dermatite atopique** (DA) est la principale manifestation d'allergie alimentaire chez l'enfant de moins de 3 ans : sur 88 observations d'AA entre 0 et 1 an et sur 191 observations d'AA entre 0 et 3 ans, la DA est le tableau clinique dominant dans respectivement 80% et 64% des cas. Néanmoins, la physiopathologie de la dermatite atopique est complexe (Bonness S, et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007) et la place de l'AA dans cette affection reste encore très débattue (Akdis CA, et al *J Allergy Clin Immunol* 2006).
Les manifestations digestives sont des manifestations également très précoces de l'APLV souvent méconnues des généralistes ou des pédiatres lorsque les symptômes sont mineurs. Une étude de cohorte de 125 nouveau-nés à haut risque atopique a montré que la majorité des enfants ayant une APLV présentaient des manifestations mineures et transitoires (régurgitations, coliques, troubles du transit plus ou moins associés à de l'eczéma ou une peau sèche), comme en témoigne une guérison naturelle validée par test de provocation orale à 6 mois de vie, chez plus de 60% des enfants atteints d'APLV (publication personnelle en cours. Communication affichée à l'AAAAI meeting, Philadelphie 2008. Cf. annexe 1).

En grandissant, les tableaux cliniques de l'AA se diversifient : DA, **urticaire, syndrome oral, angioedème**, manifestations respiratoires, choc anaphylactique….Si l'AA s'exprime surtout chez l'enfant et le jeune adulte, il est désormais établit que **le choc anaphylactique** est le mode d'expression dominant de l'AA au-delà de 40 ans (Moneret-Vautrin et al. *Curr Allergy Asthma Resp*. 2005). L'association de certains facteurs, a fortiori plusieurs : effort postprandial, consommation d'alcool et prise de certains médicaments est statistiquement corrélée avec la survenue d'un choc anaphylactique. Le céleri, les crustacés et le sésame sont les aliments à l'index anaphylactique le plus puissant.
Chez l'enfant, les principaux aliments en cause sont **le lait**, **l'œuf, l'arachide, les divers fruits secs à coque, le soja, le poisson**. La prévalence des allergies à la **farine de blé** est probablement sous-estimée. (Niggemann B., *J Allergy Clin Immunol* 1998) ont étudié 107 enfants atteints de DA ayant bénéficié de tests de provocation orale. La prévalence de l'AA dans cette population est estimée à 51% et les principaux aliments incriminés sont l'œuf (70%), le lait de vache (51%), la farine de blé (44%) et le soja (16%). Pour Rancé, **la moutarde** est le quatrième allergène alimentaire de l'enfant, derrière l'œuf, l'arachide et le lait de vache (Rancé F., *Pediatr Allergy Immunol* 1999). Depuis plus de vingt ans (Speer F, *Ann Allergy* 1975; Hill, *J Pediatr* 1986), on observe une augmentation de la prévalence des **allergies alimentaires multiples** caractérisées par une DA précoce et sévère associée à une entéropathie d'hypersensibilité avec une cassure de la courbe de croissance. Chez le nourrisson (NRS), ce syndrome se traduit par la persistance des symptômes sous lait hypoallergénique à base de soja ou hydrolysats poussés de protéines de lait, nécessitant une alimentation à base d'un mélange d'acide aminés. Le suivi au delà de 3 ans, montre le plus souvent la persistance de l'AA au lait, à l'œuf et à l'arachide (Hill, *Ann Med* 1999).
Chez l'adulte, la proportion d'AA aux protéines animales diminue sensiblement au profit des protéines végétales et pour être exhaustif, la liste des aliments à tester est longue. Selon les données du CICBAA, les principaux allergènes comprenant le groupe des végétaux croisant avec le latex, les fruits de la famille des rosacées, les ombellifères, les divers fruits secs à coque et l'arachide ne représentent que 50% des AA. Il faut y ajouter l'œuf (4.5%), le sésame (3.5%), le blé (3.5%), les crustacés (3%) etc…

L'asthme est une forme d'expression de l'AA souvent méconnue. Dans une étude rétrospective de 32 cas d'anaphylaxie mortelle, Bock (Bock et al. *J Allergie Clin Immuno* 2001) a montré que la consommation d'arachide ou de fruits secs à coque était en cause dans 90% des cas. Les accidents sont survenus alors que le diagnostic d'AA avait été établi préalablement dans plus de 95% des cas. Dans 31 cas, les sujets sont décédés d'un asthme aigu grave, la plupart ne disposaient pas de trousse d'urgence au moment de l'accident.
Pour Baena-Cagnani (Baena-Cagnani et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001): l'AA est le facteur déclenchant ou aggravant chez 2 à 8.5% des enfants asthmatiques. Chez l'adulte, un asthme professionnel aux protéines alimentaires peut se compliquer secondairement d'une AA. Si la consommation d'alcool est le facteur déclenchant d'un asthme, une intolérance aux métabisulfites doit être évoquée, sans oublier une anomalie de l'aldéhyde déshydrogénase 2, notamment chez un sujet d'origine asiatique (Saito et al. *Intern Med* 2001).

Divers symptômes digestifs peuvent correspondre à une AA. Chez le NRS, notamment (de Boissieu et al. *Allerg Immunol* 2000) ce diagnostic doit être pris en compte devant un reflux gastro-eosophagien avec œsophagite. Des tableaux de gastrite, de gastro-entérite à éosinophile, de diarrhée chronique avec malabsorption, certaines maladies de Crohn ou rectocolites hémorragique (Moneret-Vautrin DA, et al. *Allergy* 2001) peuvent être attribuées à une AA. La constipation chronique chez l'enfant (Daher et al. *Pediatr Allergy Immunol* 2001) et le syndrome du côlon irritable chez 10% des adultes, peuvent correspondre à des formes « résiduelles » d'une AA méconnue.

La liste des tableaux digestifs liés à une AA s'allongent depuis ces dernières années et les recommandations afin d'en améliorer le diagnostic s'affinent. C'est notamment le cas pour le diagnostic des gastro-entérites ou des eosophagites à éosinophiles (Spergel JM. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007): la multiplication des descriptions endoscopiques, les recommandations techniques concernant la biopsie des lésions s'ajoutent à la mise au point de critères histologiques diagnostiques. Une analyse particulière des pH-métries en cas de régurgitations anormales (Cavataio et al. *Arch Dis Child*. 1996) ou bien la généralisation de la pratique des atopy patch tests aux aliments donnent aussi un nouvel éclairage pour en analyser les mécanismes sous-jacents. (Canani RB, et al. *Allergy* 2007).
Dans les tableaux plus anecdotiques, on rapporte des manifestations ORL pouvant correspondre à une AA : **otites moyennes** récidivantes (Luyasu et al. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2005), **syndrome auriculo-temporal bilatéral** (Karunananthan et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002) et **aphtoses buccales**.
Tous les organes semblent pouvoir être la cible d'une hypersensibilité alimentaire. Les publications sont rares et les premières observations méritent d'être vérifiées par d'autres équipes. Hafstrom (Hafstrom et al. *Rheumatology* 2001) a publié en 2001, un intéressant travail sur la **polyarthrite rhumatoïde** où les sujets répondant au régime sans gluten expriment des Ac anti-gliadine.
Divers **tableaux neurologiques** sont décrits dans la littérature: un malaise atypique avec léthargie postprandiale s'accompagnant parfois de pâleur ou vomissements doit faire évoquer une AA. Celle-ci peut parfois prendre le masque singulier d'une a**taxie cérébelleuse** (Bushara et al. *Ann Neurol* 2001), de crises d'épilepsie ou de **céphalées** correspondant à des formes atypiques de maladie cœliaque (Hadjivassiliou et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, Hadjivassiliou et al *Neurology* 2006).
Enfin, pour terminer, la sphère uro-néphrologique peut être concernée: quelques observations de **syndrome néphrotique** et **cystite à éosinophiles** ont été attribuées à d'exceptionnelles AA (Lagrue et al. *Kidney Int Suppl* 1989).

I-2 Moyens cliniques du diagnostic de l'allergie alimentaire

I-2-1 Premières données de l'interrogatoire et de l'examen clinique

L'efficience maximale de la procédure diagnostique ne dépend pas uniquement des performances des moyens diagnostiques (sensibilité, spécificité, reproductibilité), mais plus encore, de leur ordre d'utilisation. L'interrogatoire est un élément diagnostique extrêmement important, pour peu que les caractéristiques de l'allergie alimentaire soient systématiquement recherchées.

I-2-1-a. Interrogatoire

Il recherche les caractéristiques suivantes :

- **Les antécédents d'atopie personnelle ou familiale.**
- **Le rythme** de manifestations lorsqu'il est postprandial, est évocateur d'AA. Un délai court entre réaction allergique et une ingestion alimentaire concerne les AA IgE-dépendantes. Ce rythme est beaucoup plus difficile à observer dans les manifestations chroniques comme la DA et certains tableaux digestifs où d'autres mécanismes immunologiques, non IgE-dépendants, sont impliqués.

- **L'association de symptômes** touchant plus d'un organe-cible (urticaire et troubles digestifs, asthme et accès d'angio-oedème, dermatite atopique et reflux gastro-œsophagien, etc.…) est un élément de très forte suspicion car l'AA est le prototype d'une maladie systémique.
- **Une pollinose préexistante** oriente a priori vers la possibilité d'une AA aux fruits ou légumes, en raison de la fréquence des sensibilisations croisées. Elle s'exprime le plus souvent par un syndrome oral aux fruits et légumes (syndrome de Lessof).
- **Une allergie au latex** oriente vers une AA à certains fruits et légumes dits du « groupe latex » : avocat, banane, châtaigne, kiwi, sarrasin, poivron… (Lavaud F, et al. *Lancet* 1992)
- **Des manifestations à l'effort** (urticaire aigue ou choc anaphylactique), ou de réaction systémique associant des symptômes cutanés, respiratoires et digestifs, doivent faire soupçonner une anaphylaxie alimentaire induite par l'effort, en relation avec un aliment consommé dans les 4 heures précédentes. Celle-ci est fréquemment liée à la farine de blé, mais tous les aliments peuvent en être la cause (Beaudouin E, et al. *Allerg Immunol*. 2006).
- **Une prise d'alcool ou de certains médicaments,** facteurs éventuels de rupture de tolérance orale aux antigènes alimentaires: **aspirine** (Morisset M, et al. *Allergie Immunol*. 2001), **AINS, traitements antiulcéreux (**Untersmayr E et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2003) ou certains traitements immunosuppresseurs tels que **le tacrolimus** par voie générale, qui stimule la réponse Th2 (Blanchard SS, et al. *Pediatr Transplant.* 2006) ou un **bétabloquant**, facteur de gravité de l'anaphylaxie du fait d'une diminution de la réponse vasculaire à des doses habituelles d'adrénaline (Moneret-Vautrin DA, et al. *Rev Med Interne.* 1993).
- **Les particularités alimentaires** méritent d'être relevées : consommation singulièrement fréquente ou abondante du fait d'activités sportives ou professionnelles, d'un contexte culturel particulier, de convictions d'ordre mystico-philosophique, d'un régime amaigrissant…
- **Les dégoûts alimentaires de l'enfant** peuvent révéler une AA. Ils ressortent très probablement de réflexes conditionnés de la petite enfance, la prise de certains aliments ayant provoqué des douleurs abdominales n'ayant pas toujours été exprimées ou comprises.
- **L'exposition cutanée ou respiratoire à des aliments** ou protéines alimentaires, surtout en poudre, entraîne parfois une AA dans certaines professions : maraîchers et personnels agricoles, industries agro-alimentaires (Schuller A, et al. *Allergy* 2005), métiers de la restauration, bouchers, boulangers etc.…

I-2-1-b. Enquête alimentaire

A la suite de cet interrogatoire, il est souvent utile de faire réaliser par le patient une enquête alimentaire (journal alimentaire tenu pendant une semaine), avant d'utiliser les outils plus spécifiques à la pratique allergologique.

I-2-1-c. Examen clinique

L'examen clinique recherche un retentissement de l'AA, en particulier un retard staturo-pondéral chez l'enfant ou un amaigrissement chez l'adulte du fait d'une malabsorption ou d'un régime excessif dans la crainte d'un nouvel accident, d'où l'importance de l'enquête alimentaire et de l'avis d'un diététicien (Christie L, et al. *J Am Diet Assoc.* 2002).
Un examen clinique attentif, en particulier du revêtement cutanéo-muqueux, peut permettre d'évoquer certains diagnostics différentiels de l'AA (mastocytose cutanée, foyers infectieux de la sphère oro-pharyngée, topographie d'un eczéma aéroporté ou de contact…).
Il est indispensable de grader l'intensité des symptômes au moment de l'examen, compte tenu du caractère chronique de l'AA. Un score est universellement utilisé pour la dermatite atopique

(SCORAD) (Kunz B, et al. *Dermatology* 1997). Il en est de même pour l'asthme (Bousquet J, et al. *Allergy* 2007) et la rhinite (Meltzer EO, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 1988).

I-2-2 Tests cutanés

En AA, compte tenu de la relative médiocrité de certains extraits alimentaires, la pratique de tests cutanés (TC) doit avoir la prééminence sur la biologie, dans la mesure ou l'interprétation des TC est possible (antihistaminiques ou autre traitement, lésions cutanées étendues pouvant interférer avec perturbant l'interprétation des tests cutanés). Leur pratique permet d'objectiver une sensibilisation à des aliments, le plus souvent liée à des IgE spécifiques, mais pouvant également reconnaître un mécanisme d'hypersensibilité retardée.

I-2-2-a. Les prick-tests

Ils témoignent d'une sensibilisation IgE dépendante apte à provoquer la libération de médiateurs chimiques, préalable indispensable à la réaction clinique. La réalisation de prick-test (PT) correspond à la pénétration dans la couche superficielle de l'épiderme grâce à une micropuncture d'un volume d'extrait alimentaire d'environ 20 µl. Si les protéines alimentaires contenues dans cet extrait rencontrent des IgE affines elles-mêmes fixées sur leurs récepteurs à la surface des mastocytes cutanés, le pontage des IgE active la cellule qui libère divers médiateurs. Certains comme l'histamine induisent une vasodilatation et vasoperméabilité locale responsable de la formation d'une papule 15 mn plus tard, en regard de la microponcture. La taille de la papule est comparée à celle du témoin positif (PT à la codéine ou histamine) et du témoin négatif (PT avec le solvant de l'extrait commercial ou sérum physiologique).

Un PT positif peut correspondre à une sensibilisation croisée non cliniquement « relevante ». Néanmoins, celles-ci sont moins nombreuses que celles objectivées in vitro, par le dosage des IgE spécifiques. Ainsi, la synthèse d'IgE dirigées contre les résidus carbohydrates des glycoprotéines synthétisées par les végétaux ou les arthropodes par exemple, peuvent induire une réactivité croisée in vitro sans traduction clinique, comme cela est observé chez certains sujets synthétisant des IgE reconnaissant à la fois les déterminants carbohydrates de pollens et ceux de venins d'hyménoptères (Ebo DG, et al. *Clin Exp Allergy* 2004).

Les PT sont réalisables à tout âge: la peau est normalement réactive chez le NRS de 3 mois dans 90% des cas, et même, dans 66 % des cas chez le nouveau-né de 10 jours.

Le risque de réaction généralisée aux PT est infime: il concernerait le NRS de moins de six mois (0.005%) (Devenney I, et al. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000) et des cas isolés de CA chez l'adulte. Selon les données du CICBAA, une réaction systémique par prick-in prick tests (prick-in PT) est observée dans 0.008 % des cas. (Codreanu F, et al. *Allerg Immunol* 2006). En règle générale, un PT à un allergène est considéré positif si le diamètre de la papule est ≥3 mm et s'il équivaut au moins à 50% du diamètre du PT avec le témoin positif.

Les PT aux aliments utilisent couramment des extraits commerciaux, cependant, la technique aux prick-in-PT aux aliments natifs est plus sensible. Pour réaliser ces tests, les aliments frais sont délayés dans du sérum salin (ex : farine) ou utilisés tels quel (ex : le lait) et la poncture est faite à travers une goutte de cette préparation. Cette technique améliore la sensibilité des TC (Rancé F., et al. *Allergy* 1997). Au delà d'une certaine taille, le diamètre des PT (diamètre moyen, ou même planimétrie) aurait une valeur prédictive significative d'AA (VPP). Plusieurs équipes ont publié des seuils prédictifs d'AA à partir du dosage des IgE spécifiques et/ou de la mesure des PT pour certains aliments, en particulier le lait, l'œuf et l'arachide (B. Niggemann, et al. *Allergy* 2005).

I-2-2-b. Les atopy patch tests

Ce sont des épicutanéo-réactions mettant en évidence une sensibilisation de type retardé. Certaines AA ne sont pas liées aux IgE spécifiques mais traduisent une sensibilisation retardée, liée à une activation lymphocytaire T. C'est en particulier le cas de nombreuses APLV chez le NRS, des AA

à expression digestive de l'enfant et l'adulte, et enfin, de certaines DA. Ces tests sont pratiqués avec des cupules "Finn Chambers" de grande taille (diamètre de 12 mm) (Niggemann B, *J Allergy Clin Immunol.* 2002) et lus idéalement à 72h. Récemment un matériel prêt à l'emploi a été commercialisé pour le diagnostic de l'APLV: Diallertest ® (Kalach N, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2005). Les atopy patch tests (APT) peuvent être pratiqués avec des aliments naturels (lait, poudre d'œuf, farine de blé diluée etc. (Isolauri E, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1996). Comme pour les PT, la sensibilité des APT lorsqu'ils sont réalisés avec du lait ou de l'œuf natifs pour le diagnostic des AA à expression digestive, est nettement supérieure, tandis que la spécificité est identique si on utilise un aliment naturel ou un extrait (Canani RB et al., *Allergy* 2007). La réalisation d'APT aux aliments en particulier lorsqu'elle est associée à des PT et un dosage d'IgE spécifiques améliore les performances prédictives. Leur performance est encore en cours d'évaluation.

I-2-3 Epreuves d'éviction

La mise en place d'un régime d'éviction, à titre d'épreuve thérapeutique, est souvent pratiquée chez le NRS suspect d'APLV car c'est souvent à cet âge, le seul aliment ingéré par l'enfant et ainsi, le diagnostic peut être facilement établi après substitution par un hydrolysat poussé de protéines de lait de vache (PLV). Les limites de cette conduite diagnostique sont les AA multiples de plus en plus fréquentes, ainsi que les allergies inattendues aux hydrolysats, même poussés. Ce cas peut représenter jusqu'à 10 % des APLV (Sampson HA, *J Pediatr* 1991; ESPGAN Committee on Nutrition. Comment on antigen-reduced infant formula. *Acta Paediatr* 1993).

Chez l'adulte souffrant de symptômes digestifs, souvent considérés comme un syndrome du côlon irritable, le mécanisme IgE n'est pas en cause (Bengtsson U, *Gut* 1996). Les TC et la détection d'IgE spécifiques ont une performance faible. Les tests de provocation orale (TPO) aux doses utiles dans l'allergie IgE dépendante ne sont pas adaptés. Il est nécessaire de recourir à des régimes d'éviction stricts d'une durée minimale de trois à quatre semaines, suivis de tests d'introduction réalistes selon une procédure particulière.

I-2-4 Tests de provocation

Leur premier objectif est de prouver l'allergie. En effet, l'existence d'une sensibilisation est une condition nécessaire mais non suffisante pour qu'il y ait AA. Les TPO, étalon-or du diagnostic, gardent leur place lorsque les tests cutanés et biologiques restent en dessous d'un seuil prédictif ou que ce seuil n'a pu être validé ou pour évaluer l'installation d'une tolérance orale. En effet, jusqu'à présent, aucun marqueur biologique ou cutané ne permet de prédire l'évolution de cette affection.

Les TPO nécessitent un cadre hospitalier. Ils respectent une procédure standardisée de simple aveugle (chez le jeune enfant) ou de double aveugle (TPO SA ou DA) car un bon nombre de symptômes subjectifs, et même objectifs, peuvent apparaître sous l'effet du stress.

Les TPO consistent en l'administration de doses croissantes à intervalles réguliers pendant une période moyenne de trois heures. La positivité réelle est établie sur la constatation de signes objectifs survenant après l'ingestion du seul aliment (Moneret-Vautrin DA, *Rev Fr Allergol et Immunol Clin* 2000).

Faits couramment dans quelques services hospitalo-universitaires, les TPO se développent considérablement depuis quelques années. Ils ont un intérêt supérieur à celui du test de provocation labiale (Rance F, *Pediatr Allergy Immunol* 1997) qui ne reflètent pas la tolérance du système digestif.

Le deuxième objectif de ces tests est de fixer le seuil réactogène. En fixant ce seuil (qui peut varier de quelques milligrammes à plusieurs grammes) ils permettent d'adapter individuellement les conseils d'éviction. D'autre part, ils permettent de suivre l'évolution naturelle, car la guérison est liée à l'installation de la tolérance immunologique au niveau intestinal.

Chez le NRS, présentant des symptômes digestifs faisant suspecter une APLV, le couplage au TPO d'un test de perméabilité intestinale (ingestion d'une solution de deux sucres Mannitol et Lactulose) est utile (Dupont C, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989). Plus récemment, des auteurs norvégiens ont montré une bonne corrélation entre manifestations cliniques et les données de l'échographie (augmentation statistiquement significative de l'épaisseur de la paroi du bulbe duodénal et du jéjunum) pratiquée avant et après TPO (Arslan G, et al. *Scand J Gastroenterol.* 2005).
Dans 3% des cas, ces TPO seraient faussement négatifs. Ceci concerne surtout les allergies gastro-intestinales et la DA ou les symptômes ne réapparaissent parfois qu'à dose importante et répétée sur plusieurs jours (Hill DJ, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1995). Les tests de provocation per-endoscopiques ont des indications spécialisées (Bischoff SC, *Gut* 1997).

II Définition et Caractéristiques des allergènes alimentaires

II-1 Définition d'un allergène alimentaire

Un allergène est un antigène susceptible d'induire une **réaction allergique.** Un consensus s'est établi au sein de *l'European Academy of Allergy and Clinical immunology* (EAACI) (Johansson, Position paper. *Allergy* 2001) pour définir l'allergie comme une réaction d'hypersensibilité initiée par un mécanisme immunologique spécifique médiée par la production d'anticorps (Ac) de type IgE ou IgG voire IgM ou IgA, ou une réaction cellulaire. Si une AA est souvent liée à la production d'IgE spécifiques, d'autres mécanismes peuvent être en cause soit par la mise en jeu d'autres Ac de type IgG dans certaines formes d'entéropathie ou de pneumopathie d'hypersensibilité aux protéines de lait de vache (PLV) par exemple, ou de type IgA dans la maladie cœliaque, ou par la mise en jeu de divers acteurs cellulaires. Parmi les cellules, les lymphocytes T ont un rôle central objectivé par les tests de stimulation lymphocytaire ou l'histologie des organes atteints … La réaction lymphocytaire T est particulièrement importante dans la maladie cœliaque ou la DA souvent associée à une AA (Sampson HA, *J Allergy Clin Immunol*1999). D'autres acteurs cellulaires sont également impliqués dans divers réactions inflammatoires spécifiques attribuées à cette affection, comme les mastocytes ou basophiles à l'origine de la libération des médiateurs induisant les manifestations cliniques immédiates; comme les lymphocytes B et plasmocytes à l'origine de la commutation et synthèse préférentielle d'IgE; comme les éosinophiles particulièrement impliqués dans les gastroentérites à éosinophiles d'origine alimentaire (Hill SM, et al. *Arch Dis Child* 1990). Cette liste n'est pas exhaustive: il faudrait également évoquer le rôle des cellules dendritiques, des kératinocytes dans l'eczéma (Li XM, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2001) mais aussi des cellules de la muqueuse intestinale (Nagata S, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*1995), etc…
Les allergènes sont des substances induisant une réaction d'hypersensibilité de mécanisme immunologique spécifique (ou allergie). La plupart des Ag induisant une allergie IgE ou IgG médiée sont des **glycoprotéines**. Dans certains cas, les déterminants carbohydrate voire des sucres purs sont à l'origine de réactions allergiques (Gay-Crosier F, et al. *N Engl J Med* 2000).
Des composés chimiques de faible poids moléculaire (PM) tels que les isocyanates ou des médicaments (ex : pénicilline) peuvent également induire des réactions allergiques IgE dépendantes (Kanny G, et al. *Allerg Immunol* 1994). Ces substances agissant comme **haptènes**, sont aussi reconnues en coopération avec le CMH, par des lymphocytes T -et activent ces derniers- au cours de certaines toxidermies ou eczémas de contact professionnel au nickel, bichromate de potassium ou formaldéhyde ….
Les allergènes alimentaires sont bien évidemment le plus souvent des glycoprotéines de PM compris entre 10 et 70 kDa (Taylor S, *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996). Cependant, dans certains cas

leur PM peut dépasser 200 kDa (allergènes oligomériques) ou bien à l'inverse, l'allergène impliqué correspond à une substance chimique de faible PM. Ceci est plutôt observé lors de contamination alimentaire par du nickel ou des antibiotiques par exemple, chez des individus particulièrement sensibles (Antico A, *Allergy Asthma Proc.* 1999; Kanny G, *Allerg Immunol* 1994).
Sicherer a proposé de classer les allergènes alimentaires en deux classes selon le mode primitif de sensibilisation (Sicherer SH, *J Allergy Clin Immunol* 2006). La **classe 1** concerne des protéines vis-à-vis desquelles la muqueuse digestive est primitivement exposée, **la deuxième classe** correspond à des allergènes pour lesquels une sensibilisation s'est primitivement établie par voie respiratoire. La classe 1 est typiquement composée de protéines stables à la digestion et pour lesquelles on observe une rupture de tolérance, favorisée par une immaturité du MALT chez le jeune enfant. Les AA aux protéines de lait, d'œuf, et de poisson en font typiquement partie.
Dans la classe 2, on retrouve le plus souvent des protéines d'allergénicité labile après cuisson ou digestion. Il s'agit le plus souvent d'allergènes provenant de fruits ou légumes dont la structure et la séquence présente une grande homologie avec les protéines de pollens, à l'origine de manifestations cliniques lors de leur ingestion, chez des sujets polliniques. Les symptômes sont souvent mineurs, limités à un syndrome oral, bien que des cas d'anaphylaxie sévère aient été rapportés.

Le lait, l'œuf, l'arachide, le soja et la farine de blé représentent 90% des allergènes alimentaires de l'enfant, tandis que l'arachide et les autres fruits à coque, le poisson et les fruits de mer représentent 85% des allergènes alimentaires impliqués chez les adolescents et adultes selon Sampson (Sampson HA, *Acta Derm Venereol* 1992). Ainsi au total 8 aliments représentent la large majorité des allergènes incriminés : le lait de vache, l'œuf de poule, le soja, la farine de blé, l'arachide et les autres fruits à coque, le poisson et les fruits de mer (Taylor SL, *Food Technology* 2001; Madsen C, *Environ Toxicol Pharmacol* 1997; Schäfer T, *Allergy* 2001; Zuberbier T, *Allergy* 2004)
Si les allergènes végétaux sont plus nombreux, les allergènes animaux sont chronologiquement les premiers impliqués dans l'histoire naturelle de l'AA (Sampson HA, *J Allergy Clin Immunol* 2004) et le lait de vache est le tout premier.
L'imputabilité des aliments diffère selon l'âge et les habitudes alimentaires. Ainsi le sésame est un allergène fréquemment incriminé dans les anaphylaxies graves de l'enfant, en Israël (Dalal I, *Allergy* 2002). Plus anecdotique, l'AA attribuée à l'ingestion de nid d'hirondelle n'est rapportée qu'en Extrême-Orient (Goh DL, *Allergy* 1999). Dans la fréquence relative des allergènes en cause chez 805 enfants de moins de 15 ans publiée par le CICBAA (*Alim'Inter vol 3 - N° 13 - Juillet 1998*), la fréquence de l'allergie à la moutarde y prend une place inattendue, en raison de son importance rapportée par F. Rancé dans le sud-ouest de la France (Rancé F, *Allergy*. 2003) alors que la sensibilisation à la moutarde est rarement cliniquement « relevante » dans l'Est de la France (Morisset M et al. *Allergy* 2003).
En 2003, au "club des huit », le sésame, la moutarde notamment ont été ajoutés dans la liste des allergènes d'étiquetage obligatoire, selon la législation Européenne (Directive 2003/89/CE du Parlement Européen et du Conseil du 10 novembre 2003).
Depuis le 22 décembre 2006, deux nouveaux allergènes ont été ajoutés : **les mollusques** et le **lupin** en raison d'une part du nombre de déclarations d'anaphylaxies sévères pour ces deux aliments, et d'autre part, de la dissémination des cas rapportés dans différents pays (Moneret-Vautrin DA, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1999)/ Morisset M, Réseau d'Allergovigilance et al. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003).
Cette directive du Parlement européen et du Conseil oblige désormais l'étiquetage des allergènes alimentaires, <u>intentionnellement</u> ajoutés par le fabricant sans limite quantitative lorsque que ces aliments appartiennent à la liste suivante des 14 allergènes (Directive 2006/142/CE de la commission du 22 décembre 2006 modifiant l'annexe III *bis* de la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du

Conseil). Bien que théoriquement, un industriel ne puisse être retenu légalement coupable d'une contamination accidentelle par un allergène donné (ex. contamination provenant d'une autre ligne de production), certaines industries agro-alimentaires comme celles produisant des aliments pour NRS et jeunes enfants ou a fortiori, celles proposant des produits pour sujets allergiques, sont particulièrement concernées par ce problème de sécurité alimentaire. De nombreux outils de mesure des traces d'allergènes ont été développés ces dernières années, afin de répondre à leurs besoins. Complémentaire à la mise place de mesures permettant d'identifier et contrôler les points critiques de la chaîne de production (méthode HACCP), (Hazard Analysis Critical Control Points), l'amélioration de la détection biologique des traces d'allergènes permet de réduire le risque allergénique. Les limites de ces contrôles sont les seuils de détection et la complexité des matrices alimentaires; l'association avec d'autres aliments étant susceptible d'interférer avec la détection des allergènes.
Certaines substances ont été exemptées de l'obligation d'étiquetage en raison de teneurs considérées comme nulles ou inoffensives chez les individus allergiques. Certaines font encore l'objet d'un moratoire pour évaluer leur allergénicité réelle. Cette évaluation passe par la détection de traces dans ces substances et l'évaluation clinique de leur allergènicité réelle.

II-2 Influence des conditions physico-chimiques sur l'allergénicité des protéines alimentaires

Comme évoqué précédemment, les allergènes alimentaires sont le plus souvent des glycoprotéines. Ces molécules sont souvent solubles dans l'eau. Leur résistance à la chaleur, à l'acidité gastrique et à la protéolyse leur confère un pouvoir allergisant d'autant plus important qu'ils ne seront dénaturés ni par la cuisson ni par la digestion (acidité gastrique, action des enzymes pancréatiques) avant d'accéder à la lumière intestinale où ils seront absorbés (Sampson HA, *J Allergy Clin. Immunol* 2004)
Un allergène de nature protidique est souvent composé de plusieurs **épitopes**. Un épitope est une séquence peptidique reconnue par la région hypervariable de l'immunoglobuline (paratope). Certaines séquences sont préférentiellement reconnues par les Ac (épitopes lymphocytes B dépendant), d'autres sont reconnues par les récepteurs des lymphocytes T (TCR).
On distingue également les **épitopes linéaires** ou **continus,** des épitopes **conformationnels**. La reconnaissance des premiers est essentiellement basée sur une séquence d'acides aminés, les Ac reconnaissant l'épitope y compris après dénaturation protéique (déroulement, déplissage). Dans certains cas, si les Ac reconnaissent aisément certaines séquences peptidiques isolées, ces dernières ne sont pas reconnues au sein d'une protéine native pour des raisons stériques.
Dans le second type, les épitopes conformationnels, la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de la protéine qui contribue à disposer certaines chaînes polypeptidiques à proximité d'autres, est à l'origine de leur formation. Les Ac ne reconnaissent plus un épitope conformationnel lorsque la protéine est dépliée. En général, les épitopes des allergènes alimentaires majeurs sont linéaires, tandis que les épitopes des pneumallergènes sont plutôt conformationnels (Lee LA, *Annu Rev Nutr* 2006). Dans certains cas les épitopes fixant les IgG et les IgE partagent des séquences d'acides aminés (Aa) communes et dans d'autres, ces séquences sont tout à fait distinctes sans aucun chevauchement (Cooke SK, *J Immunol* 1997). Comme pour les allergènes, un épitope est immunodominant s'il est reconnu par plus de 50% des sujets allergiques (Beyer K, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003)
Cette distinction entre épitopes continus, si elle aide à la compréhension, est probablement trop simpliste. En réalité nous avons probablement plutôt affaire à un continuum allant de l'épitope continu -absolument indépendant des conditions physico-chimiques pouvant interférer sur la structure protéique IIaire, IIIaire ou IVaire- à l'épitope 100% conformationnel. Ainsi, un Ac peut

reconnaitre une séquence continue primaire d'Aa comme un épitope conformationnel connu, si elle en a adopté sa structure secondaire (ex. épitope au sein d'une hélice alpha). De plus, un Ac peut reconnaître certaines parties d'un épitope conformationnel similaires à un épitope linéaire donné, mais avec une affinité réduite comparée à celle de l'épitope continu complet de référence. Ainsi, les méthodes de cartographie des épitopes utilisant des petits peptides synthétiques de 6-8 Aa pour déterminer le site de fixation des Ac, peuvent être faussées car les Ac reconnaissent facilement les épitopes linéaires au risque de négliger certaines régions impliquées dans la structure de l'épitope conformationnel.
Les procédés de transformation alimentaires englobent un ensemble d'opérations unitaires mécaniques et thermiques, tels que mélange, homogénéisation, pasteurisation, stérilisation, cuisson/extrusion. Chacune de ces opérations imposent à la fois des contraintes de cisaillement et un chauffage et des phases de refroidissement. Au cours d'une préparation alimentaire industrielle, où se succèdent plusieurs de ces opérations unitaires, une protéine dans un aliment est donc soumise à des contraintes répétées pouvant altérer sa structure. Ces changements de structure n'affectent a priori que les protéines dites globulaires, c'est-à-dire ayant une structure secondaire (présence d'hélices α et de feuillets β) et tertiaire (agencement dans l'espace des structures secondaires), voire quaternaire (assemblage de plusieurs molécules protéiques). C'est le cas de la plupart des protéines alimentaires animales (protéines de lactosérum, de blanc d'œuf, de viande et de poisson) et végétales (par exemple, protéines d'arachide, de soja, de pommes de terre, de blé, de colza). Mais ce n'est pas le cas de la caséine, qui n'a quasiment pas de structure secondaire (Sanchez C, *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003).

II-2-1 Protéolyse digestive

L'hydrolyse enzymatique est capable d'altérer un épitope séquentiel ou conformationnel, sous réserve que l'enzyme utilisée scinde la molécule au niveau du site de l'épitope. C'est le principe d'action des enzymes digestives. Les enzymes du tractus digestif les plus connues sont la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. La pepsine du suc gastrique en présence d'acide chlorhydrique, hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des acides aminés aromatiques (juste après). La trypsine, enzyme pancréatique, clive les protéines au niveau de l'extrémité C-terminale des Aa lysine et arginine, sauf quand ils sont suivis par une proline. La trypsine est une endopeptidases, qui clive les chaines protéiques plutôt en leur centre qu'au niveau de leurs extrémités. La chymotrypsine est aussi une enzyme pancréatique qui clive la protéines au niveau des extrémités carboxyliques des Aa suivants: tryptophane, tyrosine, phénylalanine, leucine, et méthionine.
Des modèles de digestion utilisant ces enzymes ont été mis au point pour essayer d'évaluer l'aptitude d'un allergène à être dénaturé par la digestion, leur résistance au processus de digestion étant un puissant facteur d'allergènicité (Astwood JD, *Nat Biotechnol* 1996). Ainsi, basée sur ce principe, toute évaluation du risque d'allergénicité d'un OGM, passe obligatoirement par l'évaluation des effets de la digestion sur la structure de la protéine (ALINORM 03/34: FAO/WHO Food Standard Programme. *Codex Alimentarius Commission*, 2003).
Dès 1980, Schwartz et al. ont montré que la β-lactoglobuline, allergène majeur du lait de vache, résistait à l'hydrolyse par la pepsine (Schwartz HR, *Ann Allergy*. 1980). Aswood et al. ont classé les protéines en 3 groupes selon le temps nécessaire pour obtenir une hydrolyse de la protéine. Dans le premier groupe correspondant aux protéines encore intactes après 1 h, on retrouve l'allergène majeur de l'arachide *Ara h* 2, des allergènes majeurs des graines de moutarde *Bra j 1* et *sin a 1* et deux allergènes majeurs du soja, la sous unité β de la βconglycinine et le STKI (l'inhibiteur de la trypsine de Kunitz). Breiteneder et al. ont montré que les superfamilles protéiques des prolamines et cupines sont très résistantes à la digestion, tandis que les protéines PR-10 (« Bet v 1-like ») semblent moins résistantes et de ce fait n'entraînent qu'un syndrome oral (Breiteneder H, *Biotechnol Adv* 2005).

Très récemment, des chercheurs chinois ont mis au point un logiciel simulant les procédures manuelles de digestion gastrique des protéines (Jiang B, *BMC Bioinformatics* 2007). Cette approche est intéressante mais a encore des limites car par exemple, selon ce modèle bioinformatique, les LTP de pomme *Mal d 3*, de tomate *Lyc e 3* et de maïs *Zea m 14*, sont considérées comme facilement digestibles alors que le rapport d'Asero et al. laisse supposer que ces protéines résisteraient à l'hydrolyse par la pepsine (Asero R, *Int Arch Allergy Immunol* 2000).

II-2-2 Influence de la température

Sous l'influence de la chaleur, on observe une modification de plus en plus importante de la structure tridimensionnelle des protéines. Celle est réversible au départ puis à partir de 55-70°C, on assiste à une dénaturation de la structure secondaire avec clivage des ponts disulfures à 70-80°C, formation de nouveaux réarrangements inter ou intramoléculaire à 80-90°C puis apparition d'agrégats à partir de 90-100°C (Davis PJ, *Allergy* 1998).
Au delà de ces températures (>100-125°C), on assiste à des transformations chimiques avec formations de liaisons entre les lysines de la protéine étudiée et les autres constituants d'une matrice de alimentaire complexe. On observe la formation de composés décrits par le chimiste nancéen, Louis-Camille Maillard (*Genèse des matières humiques et des matières protéiques*. Ed Masson1913). La **réaction de Maillard** est, aujourd'hui, connue comme étant un ensemble complexe de réactions mettant en œuvre des composés présentant des groupements réducteurs (aldéhydiques ou cétoniques), et des composés aminés qui réagissent entre eux pour produire des substances aromatiques et colorées. Les composés à groupement carbonyle (C=O) peuvent être des carbohydrates (sucres) ou des produits d'oxydation des lipides. La fonction amine peut provenir d'acides aminés proprement dits, de protéines ou d'amines naturelles ou exogènes. Cette réaction est aussi dénommée **« brunissement non-enzymatique** ». Ces réactions sont recherchées (et contrôlées) dans le but d'améliorer les qualités sensorielles de certains aliments (viande rôtie, pommes de terre frites, croûte du pain, café torréfié,…).
On distingue trois principales étapes au cours de phénomènes successifs ou simultanés regroupés sous le terme « réaction de Maillard ». La première étape comprend la condensation d'un acide aminé avec un sucre réducteur pour former des produits de réarrangement d'Amadori ou Heyns (Hodge JE. *J. Agric. Food Chem.* 1953). La seconde étape regroupe au moins 4 voies de dégradation des produits issus de ces réarrangements. Elles dépendent du substrat et constituent, elles-mêmes un ensemble complexe de déshydratations, éliminations, cyclisations, fragmentations,…conduisant à un pool de molécules intermédiaires et de composés de flaveur. La troisième étape correspond à la formation des pigments dénommés souvent « mélanoïdines» et qui sont, sur le plan chimique, des acides polycarboxyliques insaturés.

Les procédés thermiques incluent la cuisson en chaleur sèche (cuisson au four, friture, cuisson à infrarouge…) et la cuisson en chaleur humide (caisson traditionnelle dans l'eau avec blanchiment ou ébullition prolongée ou cuisson à la vapeur, au four à microondes ou autoclave et extrusion).
Le plus souvent, la cuisson contribue à diminuer leur allergènicité et c'est par exemple le cas pour l'œuf (Des Roches A, et al. *Allergy* 2006).
Il existe néanmoins des <u>variations individuelles</u> de réactivité aux aliments crus et cuits selon l'allergène en cause chez un individu donné.
- L'allergène majeur du poisson, la parvalbumine, est un allergène thermorésistant, néanmoins, on rapporte des variations individuelles comme l'illustre la description historique datant de 1921, du test de Prausnitz-Kustner ou test de transfert de sensibilisation passive. Prausnitz s'était injecté dans l'avant-bras le sérum d'un de ses collaborateurs, nommé Kustner, allergique au poisson. L'injection intradermique d'un extrait de poisson dans la zone ayant reçu le sérum de Kustner 24 h avant, a

provoqué une papule urticarienne locale. Dans cette observation princeps, Kustner ne réagissait qu'au poisson cru (Prausnitz C, *Centralbl Bakteriol Abt Orig* 1921).
La parvalbumine est un allergène thermorésistant, cependant, une cuisson prolongée et à haute température comme celle qu'on pratique dans les usines de production de thon en boite, permet d'en dénaturer totalement les allergènes comme cela a été démontré par l'équipe de Sampson (Bernhisel-Broadbent J, *J Allergy Clin Immunol* 1992/ Kelso JM, *J Allergy Clin Immunol*. 2003).
- Les protéines de lait (caséines et alpha-lactalbumine surtout), gardent leur pouvoir de liaison aux IgE spécifiques après chauffage à 80-100° pendant 15 minutes (Wal JM. *Allergy* 2001). Si l'unique allergène en cause est la sérum albumine bovine -allergène mineur thermolabile-, le lait et la viande de bœuf pourront être consommés sans danger après cuisson prolongée (lait bouilli pendant 10 mn, ragouts…). Un lait écrémé bouilli pendant 10 min a montré une forte réduction du potentiel allergénique des caséines et des protéines sériques (diminution de la capacité à lier des IgE), l'effet étant le plus marqué pour l'albumine bovine de sérum, la β-lactoglobuline et les immunoglobulines (Gjesing B, *Allergy* 1986).
- De même, si les allergènes des fruits du groupe Rosacées impliqués dans le syndrome de Lessof des polliniques résidant dans le Nord-est de la France, sont thermolabiles, ceci n'est pas applicable aux sujets vivant en région Méditerranéenne (Asero R. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999/ García-Sellés FJ, et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002/ Vassilopoulou E, *Int Arch Allergy Immunol.* 2007). En effet, les équipes italiennes, grecques et espagnoles ont publié des réactions parfois sévères après ingestion de ces fruits, sans que leur cuisson préalable réduise l'intensité de la réaction. Ces réactions particulièrement importantes avec la pêche, sont liées à une allergie à des protéines thermorésistantes à la cuisson et la digestion, les protéines de transfert lipidiques (LTP) (Gamboa PM, et al. *Allergy* 2007)
En général, une augmentation de la température et du temps de chauffage conduit généralement à une plus grande réduction de l'allergénicité des protéines, néanmoins, certains modes de cuisson l'accroissent.
Martinez San Ireneo et al ont montré que le fait de faire bouillir préalablement les lentilles pendant 15 mn au lieu d'une cuisson à 40°C avant la préparation de l'extrait permet d'obtenir des extrait dont la positivité est plus pertinente pour diagnostic d'allergie à la lentille (Martínez San Ireneo M, et al. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001)
L'allergénicité de l'arachide grillée est supérieure à celle de l'arachide crue ou bouillie. Ceci pourrait expliquer la différence de prévalence de l'allergie aux USA et en Europe ou l'arachide est consommée grillée et la Chine ou elle est essentiellement consommée bouillie (Beyer K, et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2001). Le rôtissage des cacahuètes contribuent à augmenter l'affinité des IgE vis-à-vis des epitopes. *Ara h 2* est un homologue d'inhibiteur de la trypsine. L'activité fonctionnelle d'*Ara h* 2 peut être mesurée à partir d'un extrait purifié. Après rôtissage, cette activité est 3 à 6 fois plus importante (Maleki SJ, *J Allergy Clin Immunol*. 2003).
Les composés de Maillard qui se forment au cours du rôtissage sont incriminés dans certaines anaphylaxies à la noix de Pécan (Berrens L. *Allergy* 1996).
La comparaison d'immunoblots incubés avec un pool de sérums de sujets ayant une AA à la farine de blé, montre une fixation plus importante des IgE sur l'extrait de croute ou de mie de pain que sur l'extrait de levain cru (Simonato B, *J Agric Food Chem.* 2001).
Si le rôtissage semble accroître l'allergénicité de l'arachide et la noix de Pecan, en revanche, Hansen et al ont montré que ce mode de cuisson ((>140° C pendant plus de 40 mn), diminue de 100 fois l'allergénicité de *Cor a 1.04* et *Cor a 2*, allergènes de noisette croisant avec certaines protéines de bouleau, respectivement la protéine PR- 10 *Bet v1* et la profiline *Betv 2* (Hansen KS, *Allergy* 2003). Il est néanmoins utile de préciser que les protéines de noisette susceptibles d'induire les réactions cliniques les plus sévères, ne sont pas thermolabiles.

Le stockage au froid peut également modifier l'allergénicité des aliments. Le stockage des pommes à 4°C augmente la synthèse d'un allergène de 17 kDa (Hsieh LS, *J Allergy Clin Immunol.* 1995).

II-2-3 Autres facteurs modifiant l'allergènicité des protéines

Certains procédés agro-alimentaires non-thermiques peuvent également modifier l'allergénicité des protéines, notamment l'irradiation (ex l'irradiation aux rayons γ), les traitements sous haute pression, le décorticage, le pelage, le broyage, le trempage, la germination et la fermentation.

● Ultrafiltration
La stabilité des LTP de pêches a déjà été évoquée (stable à 121 °C pendant 10 à 30 min). Seule une étape finale d'ultrafiltration permet d'obtenir un jus de pêche garanti sans allergènes au prix d'une perte notable des qualités gustatives du jus de pêche (Brenna O, *J Agric Food Chem* 2000).

● **La germination** n'est pas connue pour modifier l'allergènicité des protéines ou produire des néo-allergènes. Néanmoins, un cas isolé d'anaphylaxie aux pousses d'orge a été récemment déclaré au réseau d'Allergovigilance en octobre 2007.

● Modification du pH
Des pH extrêmes peuvent modifier également la structure des protéines et induire l'expression de néo-allergènes comme cela a été observé dans les produits d'hydrolyse du gluten comme composant de marshmallows (Lachance P, *J. Allergy Clin. lmmunol.* 1988) et les isolats de protéines de blé qu'on retrouve dans les charcuteries (pâtes, saucisses…) (Leduc V, *J Allergy Clin Immunol* 2003).

● Effet de la cuisson au four à micro-ondes
L'effet des micro-ondes a été très peu étudié. Un chauffage de la farine de lupin pendant 30 mn, n'induit que des altérations mineures de son allergènicité. Il en est de même après extrusion ou ébullition. Seul un traitement à l'autoclave à 138°C et 2,56 atmosphères, pendant au moins 30 mn, altère son allergènicité (Alvarez-Alvarez J, *J Agric Food Chem*. 2005).
Une étude a également été menée avec le blé (Leszczynska J, *European Food Research and Technology* 2003). La cuisson de la gliadine au micro-onde augmente sa réactivité lorsque l'énergie délivrée avoisine 30-40 kJ. Au delà, on observe une diminution progressive de son immunoréactivité.

● Irradiation aux rayons γ
L'irradiation aux rayons gamma semble altérer l'allergénicité de la crevette. La réduction d'allergénicité est proportionnelle à la dose d'irradiation (Byun MW, *J Food Prot.* 2000). Des résultats similaires sont observés avec l'α-caséine et la β-lactoglobuline ou l'ovomucoïde de poule. Parallèlement à cette réduction d'allergénicité, on observe une diminution de la solubilité des protéines du lait de vache, du fait de formation d'agrégats protéiques (Lee JW, *J Food Prot.* 2001/ Lee JW, *J Food Prot.* 2002).

● La fermentation
Elle contribue le plus souvent à diminuer l'allergénicité des protéines alimentaires. Cela a été montré pour le **soja** et le **blé** (Kobayashi M. et al. *Int J Mol Med.* 2004) dont les allergènes sont totalement hydrolysés au cours du procédé de fabrication de sauces de soja.
Le principe d'hydrolyse des allergènes par les ferments traditionnels japonais et en particulier du koji qui est un riz inoculé avec *Aspergillus oryzae* et utilisé pour la fabrication ultérieure du miso,

saké ou de la sauce de soja, a été repris pour modifier l'allergènicité de l'arachide. Pan et al. en collaboration avec l'équipe de Sampson, ont comparé l'efficacité d'un mélange probiotique ImmuSoy® (Nichimo Cie, Japon) composé d'*Aspergillus oryzae* et de bactéries lactiques (*Pediococcus parvulus* et *Enterococcus faecium*) par rapport à *Lactobacillus rhamnosus* LGG sur un modèle murin d'allergie à l'arachide. Les auteurs ont montré l'absolue inefficacité de LGG. En revanche, Immusoy® réduit significativement, selon la concentration utilisée, de 30 à 50%, le nombre de souris présentant une anaphylaxie à l'arachide après test de provocation. (Pan W, *J allergy Immunol* 2006).
Des auteurs italiens ont montré que la fermentation de la farine de blé par un mélange probiotique (VSL#3, laboratoire Sigma-Tau Pharmaceuticals Inc. Gaithersburg, MD) était capable d'hydrolyser les épitopes du gluten en cause dans la maladie cœliaque (De Angelis M. *Biochim Biophys Acta.* 2006). Ultérieurement, cette même équipe a étudié l'hydrolyse des allergènes en cause dans l'allergie à la farine de blé (De Angelis M, *J Food Prot.* 2007).

III EXTRACTION DES ALLERGENES

Si les extraits allergéniques sont certes, comme cela sera développé ultérieurement, souvent moins performants que les aliments naturels pour le diagnostic de l'AA, ceux-ci sont néanmoins indispensables pour la pratique de tests biologiques. Ils ont d'autre part l'avantage d'une meilleure reproductibilité et disponibilité (ex : difficulté d'obtention de fruits frais à toute saison …).
Les allergènes alimentaires étant pratiquement exclusivement des protéines, les méthodes d'extraction/purification utilisées reposent donc sur la chimie des protéines.

III-1 Principes de la production d'extraits allergéniques

Différentes méthodes d'extraction des allergènes alimentaires ont été développées afin de pouvoir obtenir l'ensemble des allergènes purifiés dans un but diagnostic (préparation d'extrait pour tests in vitro et tests cutanés) mais aussi thérapeutiques (immunothérapie). Manifestement, la fabrication d'extraits alimentaires pose souvent un problème car la réalisation de prick-in-prick tests avec l'aliment frais natif offre une meilleure sensibilité tout en gardant sa spécificité, en particulier pour les fruits aqueux et certaines graines comme le sésame. Ces méthodes d'extraction sont effectivement soumises à diverses contraintes.

La première est d'extraire l'ensemble des allergènes. Certaines protéines, compte tenu de leurs propriétés physico-chimiques, ne peuvent être extraites que dans certains solvants. Par exemple, pendant longtemps, les extraits aqueux commerciaux disponibles pour le diagnostic de l'allergie à la farine de blé n'ont permis que de tester la fraction soluble albumines-globulines, si bien que la sensibilisation à certaines fractions du gluten (non hydrosoluble) n'était pas objectivée (Battais F, *Clin Exp Allergy* 2003), responsable d'une sous-évaluation de certains tableaux comme l'anaphylaxie à la farine de blé induite par l'effort, lorsque seuls les extraits commerciaux étaient utilisés. Jusqu'à ce jour, pour le diagnostic de l'AA, les PT sont préférentiellement réalisés avec des aliments frais ou congelés (Dreborg S. *Allergy Proc* 1991). Ortolani et al. par exemple, ont comparé la réactivité cutanée chez des sujets polliniques présentant un syndrome oral à certains fruits et légumes. Pour la pomme, l'orange, la tomate, la carotte, la cerise, le céleri et la pêche, la sensibilité des prick-in-prick tests aux aliments frais s'avérait supérieure à celle des prick-tests effectués avec les extraits commerciaux testés (Ortolani C, *J Allergy Clin Immunol.* 1989).
Dans certaines anaphylaxies au sésame, le diagnostic est encore plus difficile car l'allergologue ne peut s'appuyer ni sur des tests cutanés -que ce soit avec un extrait commercial ou avec des graines

de sésame natives-, ni sur une recherche conventionnelle d'IgE spécifiques par les méthodes immuno-enzymatiques actuellement commercialisées (Immunocap Phadia, DPC…). Ces allergies au sésame sont liées à une protéine récemment identifiées : l'oléosine (V Leduc, *Allergy* 2006). Cette protéine composée de 2 sous-unités de 15 et 17 kDa, contenue dans les corps huileux de la graine de sésame, ne peut être mis en évidence qu'après des procédures particulières d'extraction (ajout de détergent, élution ionique, traitement chaotropique à l'urée…)

La deuxième contrainte est que les procédés d'extractions des allergènes ne doivent pas altérer leur allergènicité. Ceci est particulièrement important lorsqu'il s'agit de protéines comportant des épitopes conformationnels (fruits et légumes aqueux), comme cela a été montré par exemple pour la pomme (Ferrer A. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005). En effet, le principal allergène, *Mal d* 1, étant un allergène thermosensible, la fabrication d'un extrait de pomme doit donc se dérouler a basse température (Vieths S, et al. *Allergy.* 1994).

La troisième contrainte est que les méthodes d'extraction doivent être reproductibles et faire l'objet de contrôles qualitatifs et quantitatifs réguliers.

La qualité et la reproductibilité des extraits sont inhérentes à la stabilité de la teneur en allergènes dans la matière première utilisée. Ceci est particulièrement difficile à obtenir pour les aliments même si l'espèce voire le cultivar est identique (Carnes J et al. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006). En effet, la teneur relative en allergènes varie sensiblement selon les conditions climatiques, le degré de maturité (Hsieh LS, *J Allergy Clin Immunol.* 1995), les pesticides et autres substances environnantes comme les traitements à l'éthylène qui accroissent l'expression des chitinases du groupe I (Sánchez-Monge R, *J Allergy Clin Immunol.* 2000) ou les traitements thermiques: stockage au froid (Hsieh LS, *J Allergy Clin Immunol.* 1995) ou cuisson (cf. chapitre sur la modification de l'allergénicité des protéines).

Au sein de l'aliment lui-même, il existe une variation importante des allergènes. Ainsi, dans la mangue, le noyau est plus riche en allergènes que la pulpe (Fernandez C, *J Clin Exp Allergy*. 1995), dans le groupe des fruits rosacées, les LTP sont essentiellement contenues dans la peau (Asero R, *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001) et pour le poisson, le taux de parvalbumine varie selon le type de musculature et un gradient rostro-caudal (Kobayashi A, *Allergy* 2006)

Les matières premières contenant les allergènes alimentaires sont donc extrêmement variées. Elles contiennent elles mêmes de nombreux allergènes mais aussi d'autres molécules irritantes ou non et sans caractère allergénique, qui devront être retirées lors des étapes de purification de l'extrait.

Extraction

Les premiers essais d'extraction datent du début du XXème siècle avec les travaux de Noon (Noon L. *Lancet* 1911). Cette étape consiste à extraire les protéines de la matière première sélectionnée, à l'aide d'un liquide extractif. Ce processus ne doit pas entraîner de modifications dans la composition, ni dans l'activité allergénique ou dans le rapport entre les différents composants. L'extraction doit reproduire, autant que possible des conditions physiologiques (contact de muqueuses et peau) qu'on essaie d'approcher par ajustement du pH et de la force ionique du liquide extractif. Certaines conditions d'extraction comme la température ou la durée, sont des facteurs d'altération de la qualité de l'extrait, notamment celle des fruits à pulpe, du fait de la thermolabilité de certains allergènes ou de la présence d'enzymes endogènes protéolytiques capables de dénaturer certaines protéines. Ce dernier phénomène nécessite l'ajout d'inhibiteur de protéases lors de la préparation de l'extrait (Vieths S, *Allergy* 1998). L'arachide est en revanche peu sensible aux modifications des conditions d'extraction. Différents liquides extractifs peuvent être employés : l'éthanol est utilisé pour l'extraction des protéines du gluten tandis que des solvants organiques (ex. éther, hexane…) permettent d'extraire des protéines présentes dans des aliments riches en lipides comme l'arachide. Les liquides extractifs contiennent le plus souvent des sels à effet tampon pour maintenir un pH stable, car celui-ci peut influencer la quantité de protéines extraites comme cela a été montré pour l'extrait de pomme (Hsieh LS, *J Allergy Clin Immunol.* 1995).

Le risque de développement bactérien est également à prendre en compte, c'est une des raisons pour lesquelles les procédés d'extraction se réalisent à basse température.

Purification

Elle consiste principalement en l'élimination de petites molécules (généralement des sels) essentiellement par dialyse ou ultrafiltration. Plus rarement, des procédés de chromatographie d'exclusion ou de fractionnement par précipitation suivie d'un relargage peuvent être appliqués. L'ultrafiltration permet aussi de concentrer l'extrait. Les chromatographies qui sont rarement utilisées pour l'obtention d'extraits conventionels d'allergènes alimentaires, contribuent en revanche à l'obtention de protéines isolées, par exemple, de certaines fractions protéiques du blé.

Conservation

La meilleure façon de conserver l'extrait tout en maintenant une activité allergénique stable, est la conservation dans le glycérol à 50% -essentiellement utilisé pour la pratique de prick-tests- ou la lyophilisation (ou cryodessiccation) (Esch RE. *Methods* 1997). La lyophilisation permet d'obtenir les extraits sous forme de poudre sèche, destinée aux préparations stériles pour IDR ou usage thérapeutique. Varjonen et al. ont étudié la conservation d'extrait de blé, orge et seigle. Ils ont montré que la fixation des IgE en Western-blot reste identique dans du glycérol à 50%, après 21 mois de conservation à 4°C et après 10 mois de conservation à 20°C. Lorsque les protéines sont reconstituées dans du phénol à 0,4%, la capacité de l'extrait à fixer les IgE diminue dès le premier mois (Varjonen E, *Clin Exp Allergy* 1996).

Standardisation des allergènes dans l'extrait

Les quantités d'allergènes protéiques présents dans les extraits sont des données internes de laboratoires et il n'existe pas de référence internationale permettant la standardisation.
Les techniques d'analyse qualitative permettent de déterminer la nature physico-chimique et éventuellement antigénique et allergénique des protéines de l'extrait étudié. Le contrôle de l'activité antigénique de l'extrait repose essentiellement sur la pratique d'électrophorèses des protéines contenues dans l'extrait, qui permet de valider la pureté de l'extrait, et des immunoélectrophorèses en présence d'IgE sériques de sujets allergiques et de sujets contrôles sains ou bien en utilisant des Ac provenant d'animaux préalablement immunisés vis-à-vis de l'allergène étudié. Ces méthodes sont utilisées pour la caractérisation de la PRI (préparation de référence interne) avant l'étape de standardisation in vivo. Lorsque la production d'un même extrait est amenée à se répéter, l'étape suivante est la standardisation in vitro afin d'assurer la production d'extraits à usage diagnostique ou thérapeutique de « puissance allergénique » constante d'un lot à l'autre, c'est à dire de capacité à fixer les IgE de sujets allergiques. Pour y parvenir, les lots produits sont soumis à une analyse qualitative et quantitative de leur contenu en allergènes.

L'analyse qualitative vise à déterminer la composition protéique à l'aide de méthodes physico-chimiques et la composition allergénique par des méthodes immunochimiques ont développées dans le chapitre précédent.
L'analyse quantitative sert à déterminer la concentration en protéines totales et la puissance allergénique relative par comparaison à la préparation de référence interne (PRI). Elle comporte le dosage de certaines activités enzymatiques (ex. phospholipase A2 des venins d'hyménoptères) ou le dosage pondéral d'allergènes majeurs.

La dégradation des allergènes au cours des procédures d'extraction ou du fait de la présence d'enzymes dans l'extrait ainsi que la variabilité de la teneur en allergènes, sont des problèmes quasi incontournables lorsqu'on utilise des extraits naturels composites et ceci contribue de façon importante à la mauvaise corrélation observée entre l'histoire clinique et le résultat des tests de

provocation d'une part et celui des tests cutanés et du dosage des IgE spécifiques d'autre part, ces derniers étant basés sur ces extraits (van Ree R. et al. *Pharmeuropa Bio* 2005). Ceci est particulièrement important pour l'exploration des réactivités croisées entre pollens et les aliments de la famille des Apiacées. Dans les études qui comparent les résultats des TPO en double aveugle (DBPCFC) à la carotte d'une part et la sensibilité des prick-tests et du dosage des IgE spécifiques d'autre part, Ballmer-Weber et al. ont montré que la sensibilité du PT avec l'extrait commercial de carotte testé ne dépassait pas 26% alors qu'elle était de 100% pour le prick-in-PT avec la carotte native crue (Ballmer-Weber BK, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2001). A contrario, le dosage d'IgE spécifiques in vitro pose des problèmes de spécificité, notamment du fait de la présence d'Ac anti-carbohydrates, objectivant des sensibilisations qui ne se traduisent pas cliniquement et pourraient générer des régimes d'éviction inutiles.

Ce constat a suscité l'amélioration des procédures de séparation et purification afin d'obtenir des extraits ne comportant qu'une unique **protéine naturelle purifiée**.
Néanmoins, ces procédures sont lourdes à mettre en œuvre, et le plus souvent elles ne permettent pas de produire un volume de protéines à l'échelle industrielle, comme en témoigne le fait qu'aucun kit commercial utilisant une protéine naturelle purifiée ne soit mis à disposition pour le dosage d'IgE spécifiques aux allergènes alimentaires, à grande échelle. Dans le domaine du diagnostic des allergies IgE dépendantes, seuls deux ImmunoCap avec allergènes naturels purifiés -l'allergène majeur du pollen d'olivier n *Ole e* 1 et un allergène mineur du pollen de bouleau n *Phl p* 4- ont été commercialisés jusqu'à présent. Ceci témoigne probablement des difficultés à poursuivre dans cette direction.
Le développement des biotechnologies en revanche, semble permettre de produire à l'échelle industrielle, des **protéines recombinantes** mimant les protéines naturelles à un côut moindre.

III-2 Synthèse des allergènes recombinants

I1 existe deux stratégies pour déterminer la séquence à cloner en vue de la production. La première consiste à partir de l'allergène natif, de le purifier, de déterminer sa séquence en acides aminés, d'en déduire la séquence en nucléotides de l'ADN qui le code, de construire cet ADN, de l'incorporer dans un vecteur qui ira infecter une cellule hôte (bactérie, levure...) dans laquelle ce gène pourra s'exprimer sous la forme d'une protéine recombinante.
La deuxième approche consiste à isoler l'ensemble des ARN messagers de la protéine qu'on cherche à synthétiser, à le faire exprimer après l'avoir copié en ADN (cDNA) dans des cellules hôtes, capables de produire en grand nombre les molécules d'intérêt. Les allergènes recombinants seront reconnus, après lyse des cellules hôtes, par les IgE de sujets allergiques. L'identification des allergènes recombinants produits passe ensuite, par l'analyse de leurs caractéristiques immunochimiques. Chacune de ces deux approches possède ses avantages et inconvénients.

• A partir de l'allergène purifié
Un nombre relativement restreint d'allergènes alimentaires hautement purifiés ont été produits.
Pour cette approche il faut tout d'abord disposer de l'allergène naturel avec un haut degré de pureté pour pouvoir le séquencer et ensuite, si la technique de purification fait intervenir des IgE de patients, les étapes préliminaires à la purification ne doivent pas altérer la structure de l'allergène.
Les techniques de purifications sont souvent lourdes à mettre en œuvre, notamment si l'allergène d'intérêt est présent en faible quantité. A l'étape ultime de purification, il faut s'assurer de l'absence d'isoformes naturelles.

De nombreux allergènes et des séquences N-terminales bloquées rendent difficile, voire impossible, le micro-séquençage nécessaire à la détermination ultérieure de la séquence oligonucléotidique (G. Peltre. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 1995).

• A partir de l'ARN-messager

La synthèse de protéines recombinantes à partir d'ARNm est une technique beaucoup moins lourde à mettre en œuvre que celle passant par la purification de protéines. En revanche, cette technique nécessite la connaissance de la séquence nucléotidique de la protéine ou de protéines de la même famille pour amplifier l'ADN. Ces deux approches ne diffèrent finalement qu'au début du processus c'est-à-dire jusqu'à l'obtention de la séquence à cloner car une fois le clone obtenu, les étapes suivantes sont identiques.

Les allergènes recombinants ainsi produits ne sont pas toujours produits dans leur configuration native par la cellule hôte (*E. coli, Pichia pastoris*…) et de ce fait, le problème de la reconnaissance des protéines par les IgE des sujets allergiques à l'aliment étudié, peut également se poser.

La caractérisation physico-chimique classique des allergènes (point isoélectrique (pI) et masse moléculaire) peut également varier, soit à cause de modifications conformationnelles, soit par l'addition à leur chaine d'acides aminés, d'un fragment protéique recombinant co-exprimé. L'identification avec les critères classiques pI et MM, reste une source de controverses. Leur caractérisation comporte néanmoins une épreuve d'inhibition par l'allergène recombinant de la reconnaissance de l'allergène natif par les IgE humaines qui permet de réhabiliter certaines isoformes recombinantes, si leur immunoréactivité est démontrée.

Différentes voies d'approche permettent d'optimaliser les stratégies de production d'allergènes recombinants et de contrôler les propriétés des protéines issues de cette synthèse.

** Etude des anticorps anti-allergène*

Des immunoadsorbants ont permis de purifier des anticorps spécifiques et donc de mieux étudier la quantité et la qualité de ces anticorps (isotypes, affinité...).

** Etude des réactions croisées entre allergènes*

La connaissance des séquences nucléotidiques ou d'Aa des allergènes permet la recherche en banque de données des identités ou homologies existant avec d'autres molécules déjà connues.

** Etude des épitopes*

La recherche des épitopes B peut se faire à l'aide d'un ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule entière, native ou recombinante, soit par la technique ELISA ou par la technique des biosenseurs. Une carte des épitopes peut être dressée et comparée à la reconnaissance de la molécule par les IgE et IgG4 humains (Shreffler WG, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2005/ Shreffler WG, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2004). Les épitopes T peuvent être étudiés par des peptides ou fragments d'allergènes obtenus soit par génétique moléculaire, synthèse *in vitro* de peptides chevauchants ou par hydrolyse enzymatique (Bohle B, *Clin Exp Allergy*. 2005). Incubés avec des suspensions cellulaires, leur capacité à induire une stimulation *in vitro* sera recherchée.

** Etude des isomorphes d'allergènes*

Leur signification au niveau de la classification des espèces du vivant et de la pathogenèse de l'allergie constituent encore un défi (Jenkins JA, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2007). Des progrès récents montrent de subtiles différences dans le spectre des iso-allergènes, à la fois selon l'origine et la nature de l'aliment ainsi que dans la réponse immunitaire d'un patient à l'autre. Ces variants moléculaires constituent des outils naturels ou recombinants pour l'étude fine de la spécificité de la spécificité de la réponse immunitaire aux allergènes.

Les allergènes recombinants sont de remarquables sources d'allergènes hautement purifiés qui ont permis de spectaculaires progrès en recherche tant fondamentale qu'appliquée pour le diagnostic et la thérapeutique. A l'instar de ce qui a été développé pour le traitement des allergies respiratoire aux pollens de bouleau avec l'utilisation de dérivés hypoallergéniques *Bet v*1 (Mahler V. et al. *Clin Exp Allergy*. 2004), les premières immunothérapies avec administration d'allergènes recombinants, émergeront dans un proche avenir, pour le traitement de certaines allergies alimentaires chez l'homme (Swoboda I et al. *J Immunol* 2007).

IV DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

IV-1 Mesure de la réaction IgE-dépendante spécifique de l'allergène

Il s'agit de la mise en évidence chez un individu, d'une synthèse d'IgE spécifiques d'un allergène alimentaire. Par définition, ces mesures d'IgE spécifiques quantitatives ou qualitatives, ne s'adressent qu'aux réactions IgE-dépendantes. Elles n'explorent donc qu'une partie des maladies allergiques et ne sont pas pertinentes dans les AA à médiation cellulaire. Jusqu'à ce jour, nous ne disposons pas d'outils biologiques permettant d'explorer de manière simple, fiable et peu couteuse, les autres allergies alimentaires non IgE-dépendantes

IV-1-1 Tests biologiques d'identification unitaire d'IgE spécifiques

La méthode qualitative repose sur les **immunoempreintes** et les **tests d'activation cellulaires** qui objectivent la fixation d'IgE sur différentes protéines allergéniques constitutives d'un aliment parfois complexe, avec un profil de fixation variant d'un individu à l'autre, tandis que la quantification des IgE spécifiques sériques, correspond à une réponse globale, toutes les IgE-réactivités entre les IgE du patient et les différentes protéines allergèniques de l'extrait sont « additionnées » dans le résultat.

IV-1-1-a. Quantification des IgE spécifiques vis-à-vis d'extraits allergéniques conventionnels :

Le terme de « RAST » (Radio Allergo-Sorbent Test), technique développée en 1967 (Wide L, et al. *Lancet* 1967), encore souvent employé à tort pour désigner de manière générique l'ensemble des méthodes de dosage des IgE spécifiques, correspond à un procédé technique qui n'est plus utilisé. La quantification actuelle des IgE sériques repose sur des méthodes immuno-enzymatiques

À de rares exceptions près, la mesure de l'IgE-réactivité sérique est réalisée avec des tests effectués en routine dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale, de manière semi-automatisée. ImmunoCap® du laboratoire Phadia et Immulite® du laboratoire DPC sont les deux principaux tests commercialisés en France. Les fabricants de ces tests ont choisi des procédés techniques variés, tant pour la présentation des allergènes que pour la séquence analytique. Les différentes techniques de dosage des IgE spécifiques ont été récemment revues et comparées par C. Hamberger et al. (Hamberger C, *Spectra Biol* 2003).

- l'extrait allergénique est fréquemment fixé par voie chimique sur un support solide afin de faciliter les étapes de lavage au cours de l'analyse. Certains industriels ont préféré une autre voie où les allergènes se présentent sous forme libre, biotinylée

- les étapes analytiques peuvent être assez différentes selon les procédés commerciaux. Par exemple, une séquence analytique commençant par la fixation des IgE sur le support solide et non par le contact des allergènes et du sérum permet d'éviter la liaison éventuelle des IgG du sérum avec les allergènes. Les trois schémas analytiques principaux actuellement commercialisés ont été publiés dans le rapport officiel français sur l'indication du dosage des IgE spécifiques dans le diagnostic et le suivi des maladies allergiques, en mai 2005, à la demande de l'HAS.
L'expression « dosage des IgE spécifiques » porte à confusion, du fait de l'absence d'étalon. Un standard OMS existe pour le dosage des IgE totales, mais pas pour les IgE spécifiques dont la mesure est exprimée en unités arbitraires (kU/l), non transposables d'un extrait à un autre, ni d'un fabricant de réactif à un autre.

Intérêt du dosage unitaire des IgE spécifiques d'allergènes alimentaires :
Le dosage des IgE spécifiques permet non seulement d'objectiver une sensibilisation à l'aliment, a l'instar de ce qui a été montré avec le diamètre des prick-tests (Cf. chapitre I-2-2-a), au delà d'un certain seuil, la valeur des IgE est prédictive d'une AA. Cela a été objectivé pour certains aliments: le lait, l'œuf, l'arachide, le poisson et le sarrasin avec une certitude entre 90 et 100% (B. Niggemann, et al. *Allergy* 2005). Sur le plan pratique, lorsqu'un patient présente un taux d'IgE spécifiques au lait, œuf, arachide, poisson ou sarrasin, supérieur ou égal à ces seuils, le diagnostic d'allergie alimentaire est certain, sans avoir à le confirmer par un test de provocation orale.
Ce seuil varie néanmoins considérablement selon les auteurs. Lorsque l'étude est effectuée chez des NRS, le seuil prédictif tend à baisser. Chez le grand enfant et l'adolescent, la VPP passe de 32 et 13 kU/l pour Sampson et al. (Sampson H et al. *JACI* 1997/ Sampson H et al. *JACI* 2001) à 5 kU/l pour Garcia-Ara et al. (Garcia-Ara et al. *JACI* 2001). La grande variabilité du seuil prédictif selon les auteurs et les pays, est probablement liée au fait que les tableaux cliniques ne sont pas homogènes d'un groupe à l'autre.

IV-1-1-b. Quantification des IgE spécifiques pour des protéines naturelles purifiées et recombinantes (PR) :

Depuis 30 ans, à la suite des premiers travaux sur la parvalbumine de la morue (Elsayed S. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1977) de nombreuses équipes ont contribué à la mise au point de procédés d'extraction et purification des principales protéines alimentaires impliquées dans l'allergie alimentaire. La comparaison du dosage d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène brut par rapport au dosage séparé d'IgE dirigées contre les principaux allergènes naturels purifiés est un préalable indispensable à l'étude de l'allergénicité des protéines isolées et il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'un extrait allergénique à teneur quantifiable et stable**.**
Palmer et al. ont ainsi montré en Immunocap®, que les IgE des patients allergiques à l'arachide reconnaissaient plus souvent *Ara h* 2 naturel que *Ara h* 1 (Palmer GW, *Clin Immunol.* 2005). Dans une étude rétrospective de 96 enfants suivis pour une allergie à l'arachide, Bernard et al. ont comparé le dosage des IgE sériques en méthode EAST (enzyme allergosorbent test) vis-à-vis d'un extrait brut d'arachide et des protéines purifiées n *Ara h 1* et 2 (Bernard H, *Allergy* 2003). Cette équipe a confirmé la supériorité du dosage des IgE anti *Ara h* 2 par rapport à *Ara h*1 pour le dépistage de l'allergie à l'arachide. Cependant, le dosage des IgE vis-à-vis ces deux protéines purifiées est moins sensible qu'un dosage d'IgE à l'extrait total, pour dépister une allergie à l'arachide chez l'enfant : 88,5% de positivité pour l'extrait total versus 77% et 56% pour respectivement n *Ara h* 2 et n *Ara h 1*.

Différentes protéines naturelles purifiées ou recombinantes peuvent être mélangées afin d'approcher la composition d'un extrait naturel. Ces mélanges ont l'avantage d'offrir un extrait où toutes les protéines allergéniques connues sont présentes et à des teneurs et proportions fixes, non

soumises aux variations d'ordre génétique ou environnementale (climat, saison, pollution, hormones,…). La sensibilité de l'ImmunoCAP composé de trois PR: r *Pru av* 1, r *Pru av* 3 et r *Pru av* 4, est ainsi supérieure à celle de l'extrait naturel pour le diagnostic de l'allergie à la cerise (Reuter A et al. *Clin Exp Allergy* 2006). Si dans un prochain futur, le diagnostic de l'AA IgE dépendante doit essentiellement reposer sur la mise en évidence d'IgE spécifiques de PR, il sera nécessaire de comparer leur immunoréactivité à celle des allergènes naturels purifiés.

Un des intérêts des PR par rapport aux protéines naturelles purifiées, repose sur le fait que la synthèse par des bactéries (*E. coli*) permet d'obtenir des protéines non glycosylées et de s'affranchir de réactivités croisées in vitro, non cliniquement « relevantes », liées aux IgE anti-carbohydrates-hydrates (CDD). En effet, dans les levures, plantes supérieures, insectes et les cellules mammifères qui peuvent être utilisés comme cellules hôtes, les protéines subissent des mécanismes post-traductionnels qui ajoutent des glycosylations. En revanche, ce n'est pas le cas dans les cellules procaryotes. Cependant, dans certains cas, l'absence de glycosylation des protéines recombinantes pourrait contribuer à réduire leur immunoréactivité et la sensibilité du test par rapport aux extraits naturels. Ainsi, les allergènes des acariens du groupe 1 produits dans les bactéries ne réagissent que dans 50 p. cent des cas avec les IgE spécifiques des patients sensibilisés aux acariens domestiques, comparativement avec l'allergène naturel *Der p* 1 ou *Der f* 1 (Pauli G. *Rev Fr Allergol* 1997). Lorsque d'autres systèmes d'expression sont utilisés comme les levures (Chua KY, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 1992) ou les cellules d'insectes (Noguchi E. et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.,* 1996) qui permettent la glycosylation des protéines recombinante, on observe une meilleure corrélation entre le dosage des IgE réalisés avec l'allergène naturel et le recombinant. De même, l'allergène r*Der f* 1 a une activité équivalente à l'allergène naturel dans les expériences d'inhibition (Noguchi E et al. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1996). Ainsi la production sur levures (*Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae* …) ou par le système baculovirus/cellules d'insectes pourrait être plus performante, pour certains allergènes alimentaires notamment ceux dérivant des arthropodes (allergènes des crustacés…). Néanmoins, d'autres facteurs non liés aux phénomènes de glycosylations peuvent également intervenir. Par exemple, *Ber e*1 de la noix du Brésil est produite sur *Pichia pastoris* car cet allergène est naturellement produit sous forme d'un précurseur que les bactéries ne savent pas maturer pour éliminer certaines régions.

Les progrès biotechnologiques permettent désormais de produire des protéines à l'échelle industrielle. Le couplage des protéines recombinantes (PR) à des méthodes immuno-enzymatiques validées a permis de commercialiser des kits de détection d'IgE sériques vis-à-vis de diverses PR alimentaires en Immunocap® (laboratoire Phadia, Uppsala, Suède):

- l'oméga 5 gliadine (r *Tri a* 19) (Matsuo H, et al. *Allergy* 2008)
- l'albumine 2S de la noix du Brésil (r *Ber e* 1) (Alcocer MJ, et al. *J Mol Biol.* 2004).
- r *Gly m* 4, protéine PR-10, *Bet v* 1 like, impliquée dans certaines anaphylaxies au soja (Mittag D. et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2004).
- *Ara h* 1, 2, 3 et *Ara h* 8, protéine *Bet v* 1 like (Mittag D, *Mol Immunol*. 2006)
- divers allergènes de la pêche: r *Pru p* 1, protéine *Bet v* 1 like, r *Pru p 3* (Díaz-Perales A, Sanz ML, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2003), et r *Pru p 4*, une profiline.
- la parvalbumine de carpe r *Cyp c* 1 (Swoboda I, *J Immunol*. 2002) et la tropomyosine de crevette r *Pen a* 1 (Reese G et al. *Clin Exp Allergy* 2006).

Les allergènes recombinants ont le gros avantage d'obtenir des extraits de composition toujours identique et de jouer sur la quantité relative de chacun des constituants de l'extrait. Dans un extrait brut conventionnel, certains allergènes naturels fragiles peuvent se perdre ou s'altérer aux cours des différents processus de purification. Dans certains kits de mesure des IgE spécifiques, une certaine quantité de PR a été ajoutée à l'extrait naturel, pour améliorer la sensibilité du test (« spiking » des extraits). Ainsi l'extrait pour l'ImmunoCap® latex commercialisé depuis quelques années par le laboratoire Phadia (Upsalla Suède) est enrichi en *rHev b 5*, allergène majeur. Plus récemment, l'extrait destiné à la détection d'IgE spécifiques de la noisette par la même technique

(ImmunoCap®) a été « spiké » avec r *Cor a* 1.04, protéine de la famille PR-10 croisant avec le pollen de bouleau (Andersson K, et al. *Allergy* 2007) afin d'augmenter les performances du test.

L'étude de la réponse des IgE ciblée sur un allergène permet de mieux comprendre les phénomènes d'allergie croisée entre différents aliments ou entre aliments et certains allergènes respiratoires. En cas d'anaphylaxie sévère, elle permet de conseiller l'éviction préventive de certains aliments pour lesquels l'homologie des protéines serait élevée. Le développement rapide dans les années à venir d'autres kits de dosage d'IgE spécifiques d'allergènes recombinant permettra de mieux cerner les sujets à risque de réaction grave. En effet, dans l'AA aux fruits du groupe des Rosacées, la mise en évidence d'IgE spécifiques vis-à-vis de protéines thermo- et gastro-résistantes comme une sensibilisation à des LTP (exemple *rPru av* 3 pour la cerise, est un facteur de gravité qui justifiera des conseils d'éviction plus restrictive. (Ballmer-Weber BK, *Rev Fr Allergol* 2007/ M. Morisset et al., *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 2008. Cf Annexe 2).
L'utilisation d'allergènes recombinants laisse espérer une amélioration de la sensibilité et de la spécificité des tests d'identification des IgE spécifiques dans le sens d'une discrimination entre allergie vraie et sensibilisation croisée non cliniquement relevante. Cela a été montré par exemple pour le diagnostic de l'AA à la carotte qui concernerait 25 % des sujets ayant une AA et vivant en Europe centrale. Ballmer-Weber et al. ont comparé la réactivité in vitro des IgE spécifiques vis-à-vis de 2 isoformes de l'allergène majeur de la carotte *Dau c* 1 (*Dau c* 1.0104 et *Dau c* 1.0201) chez des patients allergiques à la carotte, des sujets allergiques aux pollens de bouleau mais non allergiques à la carotte et chez des témoins non atopiques. La mise en évidence d'IgE spécifiques à *Dau c* 1.0104 permet de diagnostiquer 98% des patients mais avec une sensibilité médiocre. En revanche, si la mise en évidence d'IgE spécifique dirigées contre l'autre isoforme *Dau c* 1.002 est peu sensible (65% de positivité en cas d'AA à la carotte), celle-ci confère une bonne spécificité - recherche d'IgE spécifiques positive chez seulement 1/25 patients polliniques mais sans AA à la carotte-, lorsque la recherche d'IgE est couplée à ces 2 isoformes (Ballmer-Weber BK, *Clin Exp Allergy*. 2005).
Le travail de C. Astier et al. (Astier C. et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2006- Cf. annexe 5) concernant le diagnostic de l'AA à l'arachide à partir des PR r*Ara h* 1, *Ara h* 2 et *Ara h* 3 a été poursuivi par une étude comportant un nombre supérieur de sujets (94 allergies à l'arachide) dont la réponse IgE in vitro, a été comparée avec celle de sujets polliniques sans AA à l'arachide et celle de témoins non atopiques. Ce travail encore non publié, portant sur la le dosage des IgE spécifiques vis-à-vis de r *Ara h* 1, 2, 3 et 8 (communication au symposium Cicbaa, Nancy 2007) a montré que lorsqu'on mesure les IgE sériques vis-à-vis de ces 4 allergènes recombinants, la sensibilité et la spécificité du test approche 99%.
Cette immunoréactivité peut être objectivée in vitro par tests d'activation cellulaire (Cf. chapitre IV-2-3). Elle peut et doit être -si l'objectif recherché est celui de contribuer au diagnostic de l'AA- au moins équivalente à celle d'allergènes naturels comme l'ont montré Swoboda et al. avec le développement de la PR de carpe r *Cyp c* 1 (Swoboda I, et al. *J Immunol*. 2002) ou plus récemment, Wallowitz et al., pour le recombinant de la globuline 11 S de sésame, *rSes i* 6, et de noix *rJug r* 4 (Wallowitz ML. *Clin Exp Allergy* 2007).

IV 1-2 Analyses immunologiques qualitatives des IgE spécifiques

IV 1-2-a. Immunoempreintes

Les **immunoempreintes** ou immunoblots, cherchent à mieux préciser l'origine de l'IgE-réactivité sérique du patient vis-à-vis d'un produit allergisant donné.

Ces tests comportent une étape initiale de séparation électrophorétique - le plus souvent en SDS PAGE - des protéines contenues dans l'extrait alimentaire testé.
Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane -le plus souvent de type PVDF (PolyVinyliDene Fluoride) - qui sera ensuite incubée en présence du sérum du patient et d'un sérum témoin. Il s'agit d'un buvardage de western ou western blot (le transfert sur membrane étant comparé à une empreinte sur buvard. Buvard = blot en anglais).
Après lavages successifs, la membrane est ensuite incubée avec un Ac anti-IgE humaine marqué (radioactif ou photosensible) qui permet de révéler l'IgE-réactivité sous forme de bandes. La position de ces dernières, en comparaison à une échelle de protéines marqueurs colorées de masse moléculaire connue (kDa), indique la réactivité du patient vis-à-vis de tel ou tel allergène dans l'extrait alimentaire testé.

IV-1-2-b. Iso-électrofocalisation (IEF)

Il s'agit d'une technique analytique qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique, donc leur charge, par migration dans un gel de polyacrylamide ou d'agarose contenant des petites molécules amphotères (les ampholytes), qui créent un gradient de pH. La migration effectuée en conditions natives, sans détergent, permet de visualiser des molécules dans leur état naturel. Les protéines dénaturées exposent à leur surface des charges naturellement enfouies, ne migrent pas dans les mêmes conditions. L'IEF permet également de visualiser les isoformes des allergènes, molécules immunologiquement très proches, issues de variations génétiques. Ces protéines peuvent également être transférées sur une membrane selon la méthode western précédemment développée, pour étudier la fixation préférentielle des IgE vis-à-vis des différentes isoformes ou de protéines masquées en électrophorèse unidimensionnelle ou en condition dénaturante.

Dans certains cas, l'étude des protéines capables d'induire une fixation des IgE se complète d'un **micro séquençage**. La bande ou le spot protéique d'intérêt est excisé du gel puis analysé en spectrométrie de masse. L'analyse protéique est complétée par une phase bioinformatique basée sur l'utilisation de logiciels spécialisés et la consultation des banques de données des séquences protéiques pour identifier les protéines candidates.
La **spectrométrie de masse Maldi-tof** (*matrix-assisted laser desorption ionization time of flight*) permet ainsi d'établir des cartes de masses polypeptidiques que l'on compare aux cartes de masse théoriques des protéines répertoriées dans les banques de données pour tenter d'identifier la nature de l'allergène en cause.

IV-1-2-c Peptides spots et microarrays

Quelques équipes depuis ces dernières années développent également des « puces à allergènes » permettant de tester simultanément l'IgE-réactivité vis-à-vis de dizaines d'allergènes différents tout en utilisant des quantités très faibles de sérum (Hiller R, et al. *FASEB J.* 2002).
Dans le chapitre précédent, nous avons vu que le développement des allergènes recombinants permettait d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic in vitro comme cela a été montré avec les proteines recombinants r *Pru av* 1, r *Pru av* 3 and r *Pru av* 4 pour le diagnostic de l'AA à la cerise (Reuter A et al. *Clin Exp Allergy* 2006) ou *r Ara h* 1, 2 et 3 pour le diagnostic de l'AA à l'arachide (G. Kanny. communication symposium Cicbaa 2007). En d'autres termes, le développement de PR, la mise au point et la combinaison de certains dosages d'IgE spécifiques d'allergènes recombinants contribuent à l'amélioration diagnostique de l'AA avec des tests plus

« cliniquement relevants ». Cette démarche correspond à ce que les auteurs anglo-saxons appellent le « **component-resolved diagnostic** » (CRD) (Valenta R, et al. *Clin Exp Allergy* 1999).
Derrière le terme microarrays ou biopuces (puces), on retrouve une multitude de techniques qui font l'objet de développements récents. Cette thèse n'a pas la prétention de développer tous les aspects de ces techniques mais seulement d'en présenter le principe. Un nombre limité a été développé jusqu'à présent pour le diagnostic de l'allergie. **Les biopuces** sont des systèmes miniaturisés qui permettent des analyses en parallèle et à haut débit. Ces outils vont rapidement passer du domaine de la recherche vers un usage plus commun, en allergologie.
Le développement de **protein microarray** (PMA) s'est appuyé sur la technologie d**es** puces à ADN ou DNA microarray dont le concept a émergé au début des années 1990 (Schena M et al. *Science* 1995), afin de pouvoir étudier non pas le génome, mais le **protéome**.
Les PMA sont bâtis sur le principe d'un substrat fixé sur une surface plane (lames de verre, membrane de nitrocellulose, …). La surface de la lame est apprêtée préalablement avec une couche de polylysine, hydrogel…, dont les propriétés physico-chimiques permettent une liaison avec la protéine étudiée, tout en conservant ses propriétés biologiques. Différentes protéines (molécules dites de capture), peuvent être testées : protéines purifiées naturelles ou recombinantes, anticorps, peptides … Ces protéines sont fixées sur la lame par un robot de manière extrêmement précise sous forme de spots microscopiques disposés en rangées et colonnes dont l'alignement est un des éléments pris en compte dans le traitement informatique des données (Mortuaire G, et al. *Annales de Biologie Clinique* 2004).
On peut schématiquement classer les microarrays en deux catégories :
- L**es *puces analytiques*** permettent la détection de protéines connues dans un échantillon complexe, selon le principe d'une interaction Ag/Ac suivant deux modalités :
1) soit la <u>protéine d'intérêt est fixée sur le support</u> puis est reconnue par un Ac.
2) soit la protéine se fixe sur un <u>Ac préalablement déposé sur le support</u> et est détectée par un 2eme Ac ou par liaison à un fluorophore.
La première technique est à rapprocher de l'ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*), l'avantage des biopuces à protéine par rapport à la technique ELISA conventionnelle, est de pouvoir étudier différentes protéines à la fois.
En 2002, Hiller et al. ont adapté le concept du CRD au format des microarrays pour la mesure d'IgE humaines dirigées contre 96 pneumallergènes recombinants purifiés (Hiller R, et al. *FASEB J.* 2002). Ces PR ont été déposées sur le support puis incubées en présence du sérum de patients. Après lavage, les lames ont été ensuite incubées en présence d'un Ac monoclonal de souris anti-IgE humaine marquée par un fluorochrome (Alexa Fluor 546 protein labeling kit). Les données issues de ces analyses ont été validées par celles provenant de méthodes référentielles pour objectiver une sensibilisation *in vitro* et *in vivo*, en l'occurrence des dot-blots avec les PR étudiées en présence du sérum des mêmes sujets allergiques et la pratique de PT avec les mêmes PR, chez les mêmes sujets.
Dans le domaine de l'AA, les PMA permettent d'identifier de nouveaux marqueurs sériques à valeur diagnostique ou pronostique. Ce principe a été retenu pour l'analyse en PMA des épitopes majeurs des allergènes majeurs de l'arachide (Shreffler WG, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2004). Les auteurs ont étudié la fixation des IgE spécifiques provenant de sujets allergiques à l'arachide et de sujets témoins sains, sur des aptamères de 20 Aa chevauchants préalablement fixés sur une lame epoxy. Ces aptamères sont des peptides de synthèse correspondant au découpage progressif de la séquence *Ara h* 1, *Ara h* 2 et *Ara h* 3.
L'équipe de Sampson a de plus montré chez les sujets atteints d'APLV, que la fixation d'IgE sériques à certains épitopes de caséine ou de β-lactoglobuline était statistiquement associée avec la persistance de l'allergie (Beyer K, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2005). Cette méthode a été également reprise pour le suivi de la cartographie des epitopes au cours de la désensibilisation orale en cas d'APLV (Alonzi C. et al. *Allergy* 2007).

Dépôt des protéines
Un robot est utilisé pour le dépôt des protéines ou des sondes oligonucléotidique sur les lames. Les extraits sont placés au départ sur une plaque échantillon. Des prélèvements successifs sont réalisés depuis cette plaque pour être déposés sur le support sélectionné. Les dépôts sont répétés pour chaque protéine en duplicata ou triplicata, ce qui permet un meilleur contrôle des résultats. Les dépôts effectués (spotting) sont de très petits volumes (< 100 nl). Le dépôt s'effectue souvent par contact direct avec le support à l'aide de fines aiguilles creuses ou pleines. Des dépôts de 100 à 500 µm de diamètre sont effectués tous les 300 à 600 µm, selon le type d'aiguilles.

Détection des protéines
Jusqu'à présent la détection des protéines notamment pour le diagnostic des maladies atopiques, est principalement réalisée en utilisant la **fluorescence** (Kim TE, et al. *Exp Mol Med.* 2002). Les protéines au sein de l'échantillon à analyser sont marquées par un fluorophore (ex. cyanine **Cy3**, **Cy5**) ou sont détectées par un anticorps marqué (FITC/cyanine). La lecture de la fluorescence procure une sensibilité allant jusqu'à 1pg/ml dans l'analyse d'un échantillon.
D'autres techniques utilisent un marquage radioactif ou la chimioluminescence.
Des avancées plus récentes combinent la fixation des protéines sur ligand spécifique et leur identification par spectrométrie de masse. La détection peut être directement basée sur la modification intrinsèque des propriétés physico-chimiques du complexe formé lors de l'interaction. Des PMAs utilisant la technologie de la SPR (*Surface Plasmon Resonance*) ou résonance plasmonique de surface sont en cours de développement.

De nos jours, **la fluorescence** semble être l'outil le plus utilisé. L'existence de plusieurs systèmes de révélation utilisables sur le même dépôt (possibilité d'un double marquage voire plus) laisse envisager les potentiels développements de cette technologie. Ce principe a été retenu pour l'identification les principaux sites de liaison des IgE et IgG4 spécifiques eux-mêmes identifiés par des Ac marqués par des fluorochromes distincts avec fluorescence rouge et verte (Cy 3 et 5) pour le diagnostic de l'allergie à l'arachide à partir d'aptamères chevauchants d'*Ara h* 2, préalablement fixés sur un support (Shreffler WG, *J Allergy Clin Immunol* 2005).
À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus quant à la meilleure méthode de réalisation des biopuces protéiques. Cette technologie offre en tous les cas les avantages d'une analyse systémique miniaturisée du protéome faiblement consommatrice de sérum dotée d'une bonne résolution (scalability) apte aux procédures d'automatisation et donc à une réduction potentielle des côuts d'analyse. A partir d'1 mg de protéines, plusieurs milliers de lames peuvent être imprimées. Pour améliorer le diagnostic de l'APLV, Schulmeister et al. ont analysé la liaison des IgE sur plusieurs protéines naturelles ou recombinantes, certains peptides d'intérêt et des extraits conventionnels de lait de vache, brebis, chèvre et humain, fixés préalablement sur une même lame (Schulmeister U., Institute of General and Experimental Pathology, Université AKH de Vienne- Allergy school on recombinant allergens. Bischoffsheim, septembre 2007), chaque lame nécessitant tout au plus 20 µl de sérum de patient. Ces procédures visent à mieux identifier le profil de chaque patient et d'améliorer les procédures CRD. Elles permettent de mieux comprendre les réactivités croisées et de comparer les performances respectives des PR par rapport aux naturels purifiés et aux extraits conventionnels.
En conclusion, les microarrays semblent des techniques très prometteuses pour l'avenir dans le domaine de l'évaluation de l'allergènicité des protéines alimentaires. Plusieurs études tendent à montrer que la sensibilité et la spécificité de ces système de détection de la réponse IgE vis-à-vis des allergènes est comparable voire supérieure aux techniques préalablement développées (Harwanegg C, et al. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2004).

IV-2 Méthodes basées sur la détection d'une activation cellulaire en présence de l'allergène.

La mise en évidence d'une activation cellulaire spécifique en présence de l'allergène alimentaire est un moyen plus complexe mais plus démonstratif de l'immunogénicité d'une substance alimentaire.
Pour objectiver l'activation cellulaire IgE-dépendante, les biologistes ont surtout étudié les basophiles sanguins du patient qui sont plus facilement accessibles que les mastocytes, cellules tissulaires. La réactivité cellulaire au contact d'un extrait du produit à tester, s'exprime sous la forme de libération d'histamine, de leucotriènes et par l'expression de marqueurs cellulaires. Du fait du pontage au moins bivalent nécessaire à cette réactivité, ces tests sont censés traduire de façon plus fidèle les réactions cliniques que les tests basés sur la détection d'une IgE-réactivité sérique. Les tests sériques ne détectent en effet que des liaisons monovalentes entre les IgE libres circulantes dans le sérum des patients et les épitopes présents dans l'extrait alimentaire.

IV 2-1 Histaminolibération leucocytaire (HLL)

Les basophiles d'un sujet présentant des IgE spécifiques vis-à-vis d'un antigène dégranulent et libèrent de l'histamine en présence de cet antigène, après pontage des IgE (Benveniste J, *J Allergy Clin Immunol*. 1977). Cette dégranulation visible au microscope a été à l'origine du test de dégranulation des basophiles humains (TDBH), abandonné depuis de nombreuses années en raison d'une sensibilité et spécificité médiocres.
L'HLL consiste à mesurer l'histamine libérée après mise en contact des basophiles en présence d'un extrait allergénique alimentaire ou d'une protéine isolée. L'histamine est mesurée avant et après incubation avec l'allergène testé à différentes concentrations. Une histaminémie totale est également mesurée après lyse osmotique en présence d'eau distillée, afin de vérifier l'absence de dégranulation des basophiles non spécifique avant le test, ainsi que l'habilité des basophiles à dégranuler. Le test mesure l'HLL en l'absence d'allergène (contrôle négatif) et en présence d'Ac anti-IgE capable d'induire une HLL non spécifique (exemple anticorps de chèvre anti-IgE humaine) (contrôle positif). Les résultats sont en général exprimés en pourcentage d'histamine relarguée par rapport au contenu total d'histamine dans le sang après lyse osmotique.
Les résultats de l'HLL peuvent être faussés par une mauvaise technique de prélèvement (garrot), par des conditions de transport défectueuses ou un délai trop long entre analyse et prélèvement sanguin). II existe plusieurs techniques de dosage de l'histamine : radio-immunologique, radio-enzymatique ou chromatographique par spectrométrie de masse (Delaage M, et al. *Allerg Immunol* 1988). Une HLL positive en présence d'un allergène donne classiquement une courbe en cloche.

L'HLL est difficilement applicable aux AA évolutives dans la mesure où on observe souvent chez les patients soit une basopénie, soit une anormale histaminolibération basale attribuée à un facteur sérique HRF (May CD et al. *Clin Allergy*. 1972/ Sampson HA, et al. *N Engl J Med*. 1984 / Sampson HA, et al. *N Engl J Med*. 1989 /Moneret-Vautrin DA et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999). Cet examen est donc restreint aux patients n'ayant qu'une AA et asymptomatiques grâce à une éviction préalable des allergènes en cause… Cet examen n'est pas un examen de routine en raison de sa difficulté de réalisation (l'examen ne doit pas être différé après le prélèvement et la technique est lourde à mettre en place).
De nos jours, cet examen fait surtout partie des différentes étapes de contrôle de l'allergénicité des nouvelles protéines allergéniques issues de la biologie moléculaire (Swoboda I, et al. *J Immunol.* 2007).

L'HLL utilise parfois des basophiles de donneurs sains préalablement sensibilisés en présence du sérum de patient allergique à l'aliment dont on teste la réactivité d'une de ses protéines ou un extrait plus complexe. (Hartz C, *Mol Immunol.* 2007)**.**

Le principe de sensibilisation passive des basophiles a été repris dans le développement de la culture de **lignées immortalisées des basophiles de rats** (RBL : rat basophil leukemia) humanisés après **transfection du récepteur humain de haute affinité des IgE (FcεR**I). Cette technique présente l'intérêt, sous réserve de l'entretien régulier des cultures cellulaires, de s'affranchir du prélèvement de basophiles humains qui doivent être « techniqués » rapidement après leur prélèvement, contrairement aux IgE sériques.
Plusieurs travaux ont été publié par l'équipe de Vieths avec la lignée RBL-2H3 (Hoffmann A, *Food Agric Immunol*, 1997). L'activation des basophiles de rat peut être objectivée par la mesure de la sérotonine (Dibbern DA Jr, *J Immunol Methods.* 2003) ou la β-hexosaminidase.
Le modèle RBL néanmoins, n'est pas une technique destinée au diagnostic individuel d'allergie mais plutôt à la comparaison de l'immunoréactivité d'extraits allergéniques. Plus récemment, la l'étude de l'allergénicité du blé a été étudiée à partir de mastocytes humanises de rat (Bodinier M, et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008).
Les tests d'histaminolibération leucocytaire à partir de basophiles humains tendent à être remplacés par l'étude de l'activation des basophiles en cytométrie de flux.

IV-2-2 Mesure de l'activation des basophiles en cytométrie de flux

Les premiers développements de cette technique datent du début des années 1980 (Nakagawa T, et al. *Allergy* 1981). L'activation des basophiles se traduit non seulement par le relargage de nombreux médiateurs pré et néoformés (histamine, divers enzymes, leucotriènes, et prostaglandines, cytokines….) mais aussi par l'expression à leur surface de divers molécules, dont il est possible de mesurer l'apparition en utilisant l'anticorps correspondant marqué par un fluorochrome dont la fluorescence émise est analysée en cytométrie de flux. Ajoutée à la combinaison de différents indices qui font la spécificité des basophiles (expression du CD45, présence d'IgE à leur surface et objectives par des Ac anti-CD45 et anti-IgE humaines fluorescents…), le pourcentage de basophiles activés peut être ainsi évalué. Les tests d'activation des basophiles (TAB) reposent essentiellement sur la mesure du CD63 (Moneret-Vautrin DA et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999) et/ou CD203c (Wallowitz ML, *Clin Exp Allergy* 2007).
Récemment, Erdmann et al. ont comparé chez des sujets allergiques aux pollens de bouleau et présentant des réaction à l'ingestion de pommes, carottes et céleri, la sensibilité et la spécificité du dosage des IgE spécifiques sériques (ImmunoCAP Phadia), par rapport au TAB utilisant des allergènes recombinants de pomme (*rMal d* 1), carottes (*rDau c* 1), et céleri (*rApi g* 1). Les auteurs montrent que la sensibilité et la spécificité des TAB n'est supérieure au dosage des IgE que pour le diagnostic de l'allergie à la pomme (Erdmann SM, *Int Arch Allergy Immunol.* 2005).
Ces tests sont sensibles et il avait été espéré qu'ils seraient cliniquement relevants vis-à-vis des allergènes croisants. Ebo et al. ont comparé la spécificité des prick-tests, des IgE spécifiques et des TAB pour le diagnostic de l'allergie alimentaire à la pomme chez des sujets polliniques (Ebo DG, *Cytometry B Clin Cytom.* 2005). Ils ont comparé les résultats de ces 3 méthodes chez des sujets allergiques aux pollens de bouleau et présentant aussi un syndrome oral à l'ingestion de pommes, des sujets ne souffrant que de pollinose et des témoins sains. Lorsque ces auteurs on comparé la performance des tests pour distinguer les polliniques isolés de ceux ayant aussi une allergie à la pomme, ils ont constaté que la spécificité du dosage des IgE à la pomme n'était que de 30% et celle du prick-test avec l'extrait de pomme (variété Jonagold) ne dépassait pas 80% tandis que la sensibilité du TAB avec l'extrait de pomme Jonagold atteignait 88% avec une spécificité de 75%.

Comme pour l'HLL, des TAB modifiés (TABm) avec sensibilisation passive de basophiles de donneurs sains -mais en général, plutôt des atopiques car l'aptitude des basophiles à dégranuler serait meilleure-, ont été développés. Beaucoup d'espoir repose sur cet outil qui selon Wallowitz et al., qui ont étudié l'activation passive par la globuline 11 S du sésame, *rSes i* 6, et de la noix *rJug r* 4, de basophiles de donneurs atopiques en présence de sérum de patients allergiques à la noix ou au sésame ou aux deux. Le TABm avec expression du CD63 et 203c, permettrait de faire la distinction pour la noix et le sésame, entre sensibilisation croisée et réactivité croisée cliniquement relevante (Wallowitz ML, *Clin Exp Allergy* 2007).
Ces techniques néanmoins onéreuses et encore chronophages et délicates à mettre en œuvre, ne relèvent encore que de la recherche et ne sont pas applicables au diagnostic individuel courant d'allergie alimentaire.

IV-2-3 CAST

Le CAST (*cellular allergen stimulation test*) est un test in vitro qui mesure également l'activation IgE dépendante des basophiles en présence de l'allergène, en mesurant la quantité de leucotriènes (LT) libérée par le basophile après incubation avec l'allergène alimentaire étudié à différentes concentrations. Le LT mesuré dans le surnageant est le LTC4. Le CAST a surtout été étudié dans le diagnostic de l'hypersensibilité à l'aspirine (Kubota Y, et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997). Peu de travaux ont été mené dans le domaine du diagnostic de l'allergie alimentaire (Raap U, *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007). Dans l'étude de Moneret-Vautrin et al. où le CAST, le dosage des IgE spécifiques et le TAB ont été comparés chez 27 patients souffrant d'allergies alimentaires variées et confirmées par TPO, la sensibilité plutôt médiocre du CAST est similaire au TAB. En revanche leur spécificité est excellente (100%) (Moneret-Vautrin DA et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999). En 2001, Vila et al. ont comparé la sensibilité du CAST, à l'HLL et aux prick-in-PT chez 40 sujets présentant des réactions alimentaires. Dans cette étude, si les prick-in-PT ont la grande spécificité, le CAST serait l'outil diagnostic le plus sensible (Vila L, *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2001). En conclusion, le CAST jusqu'à ce jour, n'a pas vraiment montré d'intérêt particulier par rapport au TAB pour le diagnostic de l'AA IgE-médiée.

IV-2-4 Test d'activation lymphocytaire

Les outils diagnostiques pour l'AA non IgE-médiée dont les modes d'expression peuvent être très variés, sont peu nombreux, exception faite de la dermatite atopique (DA) pour laquelle la pratique d'APT aux aliments est une méthode simple à mettre en œuvre. Néanmoins, bien que les APT s'avèrent très spécifiques pour le diagnostic de la dermatite atopique induite par l'AA, la sensibilité des APT y compris pour la DA reste médiocre (Heine RG, *Pediatr Allergy Immunol.* 2006).
Par conséquent beaucoup d'espoir réside dans la mise au point d'outils biologiques pour le diagnostic des AA non IgE dépendantes. La physiopathologie repose souvent sur une hypersensibilité à médiation cellulaire où les lymphocytes T ont généralement un rôle central. C'est la raison pour laquelle les biologistes ont tenté de mettre au point des tests d'activation des lymphocytes T par mise en culture des lymphocytes T du patient en présence des protéines alimentaires incriminées. Le test se base sur le fait que les lymphocytes sensibilisés à l'allergène (Lymphocytes T mémoires), lors d'une nouvelle exposition avec l'allergène, se transforment en lymphoblastes et activent d'autres lymphocytes et induisent leur prolifération. Ceci se traduit par une augmentation de la production d'ADN qui peut être mise en évidence, soit par l'incorporation

d'une base nucléotidique radio marquée (Thymidine tritiée *) 5 à 12 h avant la fin du test avec une mesure puis comparaison de la radioactivité induite par rapport à une culture des lymphocytes à l'état basal, ou soit par l'incorporation de methyl thiazolyl tetrazolium (MTT).

De nos jour, les TTL (tests de transformation lymphoblastiques) tendent à être remplacés par des tests en cytométrie de flux avec mesure de l'expression de marqueurs précoces d'activation (CD69) après 24-48 h ou plus tardifs qui apparaissent après 5 à 7 jours de culture: CD71 (récepteur à la transferrine) ou CD25 (récepteur de l'IL2), ce dernier étant restreint à une population lymphocytaire particulière plutôt propice à l'installation d'une tolérance à l'allergène en cause (Cozon JNG et al. John Libbey Eurotext, Ed. 2006).
Divers antibiotiques et aliments nutritifs peuvent être apportés au milieu de culture, -parfois responsable d'activation lymphocytaire chez des sujets sensibilisés à ces substances, d'où l'intérêt de comparer la prolifération lymphocytaire en présence d'allergène à une prolifération spontanée des lymphocytes, sans ajout d'allergène-. Une culture des lymphocytes en présence de substance lymphoproliferative, non spécifique soit la PHA (phytohemagglutine A) ou le pokeweed (PKW) est réalisée (témoin positif). Afin de vérifier l'absence de stimulation non spécifique, les lymphocytes sont parfois aussi mis en culture en présence d'un autre allergène « non relevant » (Kondo N, *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1997).
Kondo et al., ont montré que la méthodologie est reproductible et spécifique de l'aliment en cause pour le diagnostic des AA non IgE médiées avec des premiers résultats encourageants, bien que la méthodologie de référence pour prouver le diagnostic de l'AA soit discutable, des syndromes de fatigue d'origine alimentaire ayant été inclus…(Kondo N et al. , *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1997). Si Kondo et al. assurent que l'indice d'activation lymphocytaire est nettement plus élevé dans les AA non IgE-médiée par rapport à celles qui relèvent d'une AA IgE dépendante, Shek et al., sont d'un avis inverse (Shek LP et al. *Allergy* 2005). Il faut remarquer qu'on observe une prolifération lymphocytaire en présence d'allergènes naturels chez des sujets sains non atopique mais cependant cette activation peut correspondre à des sous-pop. lymphocytaires différentes.
Bohle B et al. ont étudié la dénaturation des épitopes B et T des protéines alimentaires à l'origine de syndromes oraux et de poussée de dermatite atopique, à l'ingestion de certains fruits ou végétaux, chez des sujets allergiques aux pollens de bouleau (Bohle B, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2006). Des TAB ont été comparés avant et après traitement thermique des allergènes recombinant suivants : r*Bet v* 1, r*Mal d* 1 de la pomme, r*Api g*1 du céleri et *Dau c* 1 de la carotte. Des tests d'activation lymphocytaires T ont été analysés avant et après traitement thermique de *Bet v* 1. Enfin, un TPO aux aliments incriminés a été réalisé avec des aliments crus et cuits. Si la réactivité des TAB est altérée après cuisson, la réactivité des TAL est inchangée. Si le syndrome oral disparait après cuisson des aliments, celle-ci n'empêche pas la survenue de poussées d'eczéma après leur ingestion. Ces éléments témoignent du fait que les épitopes B des protéines PR 10, sont thermolabiles contrairement aux épitopes T.

Peu d'études ont été menées avec les nouvelles techniques utilisant les marqueurs d'activation des lymphocytes T en cytométrie de flux. Beaucoup d'espoir se fondent sur la mise en évidence de populations lymphocytaires spécifiques qui seraient les indicateurs de l'installation d'une tolérance ou de la persistance d'allergie alimentaire (Tiemessen MM, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2004) d'une part et du dosage des cytokines (ex IL10, IL4, IL13, IFNγ…) dans le surnageant des cultures lymphocytaires en présence des protéines alimentaires (Shinbara M, et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996). Récemment, Tay et al. ont étudié les TAL à l'ovalbumine, à l'ovomucoïde et à la toxine tétanique, chez des sujets allergiques à l'œuf en comparant les sujets devenus tolérants et ceux pour lesquels l'allergie à l'œuf persiste ainsi qu'un groupe de sujets non allergiques (Tay SS, et al. *Clin Exp Allergy*. 2007). Des TAL positifs à ces deux protéines sont observés dans les trois groupes sans différence significative concernent l'intensité de la

stimulation lymphocytaire, ce qui témoigne du caractère peu spécifique de cette méthode. La comparaison de la production d'IL4 et d'IFNγ intracytoplasmique entre ces trois groupes est tout aussi décevante puisqu'elle ne montre pas non plus de valeurs significativement différentes entre les groupes, contrairement à ce qui avait été objectivé par d'autres auteurs ayant étudié les cytokines du surnageant des TAL à l'arachide ou aux protéines d'œuf.

Dans les techniques de PMA appliquées au diagnostic del'APLV, comme pour ce qui a été observé pour les IgE spécifiques (Alonzi et al. Göteborg, EAACI 2007), des TAL ont été réalisés chez des patients suivi pour APLV, en présence d'épitopes chevauchants de la caséine alpha s-1 du lait de vache pour rechercher des épitopes dominants. Ces TAL n'ont pas objectivé de peptides dominants marqueurs d'acquisition de tolérance ou de persistance de l'APLV (Ruiter B, et al. *Clin Exp Allergy*. 2006).

V IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES ALLERGENES : APPLICATION A LA DETECTION DES TRACES D'ALLERGENES

V-1 Généralités

L'anaphylaxie induite par des allergènes masqués représente un vrai problème de santé publique comme cela a été objectivé depuis plus de 30 ans. (Lockey *Ann Allergy* 1971; Miller *Ann Allergy* 1978, Foucard T, et al. *Allergy* 1999).
En 1995, Moneret-Vautrin et al. ont mené une étude les facteurs de risque de l'anaphylaxie alimentaire grâce à l'analyse de 81 cas d'AA grave (Moneret-Vautrin et al. *Bull Acad Natl Med* 1995): un allergène alimentaire était présent sous forme masqué ou consommé par inadvertance dans 30.8% des cas. Bock (Bock SA, *J Allergy Clin Immunol* 2001) a analysé 32 cas d'anaphylaxie alimentaire létale : dans 31 cas, l'AA et l'allergène alimentaire était connus et l'aliment responsable du décès avait été consommé sous forme masquée. Aux USA, on estime que 30000 anaphylaxies alimentaires sont prises en charge chaque année et qu'elles sont à l'origine de 150 à 200 décès par an (Sampson HA. Pediatrics. 2003). Ces faits ont été déterminants dans la prise de conscience des pouvoirs publics et des industriels des conséquences induites par des erreurs d'étiquetage ou des contaminations accidentelles. Ainsi, en 1999, la présence d'allergènes non déclarés dans les produits alimentaires étaient la principale cause du rappel et retrait des ventes aux USA (Vierk KA, *J Allergy Clin Immunol* 2002/ Vierk KA *J Allergy Clin Immunol.* 2007).
Le réseau d'Allergovigilance en France a publié un premier rapport sur les réactions anaphylactiques alimentaires en 2002, permettant d'objectiver sur 107 cas, 14 observations (13,1%) liées à l'ingestion d'allergènes masqués (Morisset M, et al. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003). Ce « meilleur » pourcentage par rapport celui publié aux USA, pourrait être le fruit des pressions exercées sur les industries agro-alimentaires pour imposer un étiquetage plus précis, au sein de la communauté européenne (*Directive 2006/142/CE de la commission du 22 décembre 2006 modifiant l'annexe III bis de la directive 2000/13/CE*).

Ces expositions accidentelles peuvent survenir dans divers environnements : contamination d'une chaine de production dans l'industrie alimentaire, accident au restaurant ou à la maison après un repas traditionnel. En cuisine, l'utilisation d'ustensiles partagés pour la fabrication de divers aliments (ex. les robots de cuisine) doit faire l'objet d'une information afin de limiter le risque de contamination. Le manque de connaissance concernant les composants alimentaires qu'ils sont amenés à manipuler ou consommer tant parmi les employés des métiers de bouche que parmi les

consommateurs, semble être un facteur de risque clef des réactions anaphylactiques sévères. Le renouvellement régulier des recettes des produits manufacturés et la diminution régulière des sujets consommant leur repas « 100% faits maison » à partir d'aliments de base, contribue aussi à accroitre le risque d'anaphylaxie à un allergène alimentaire masqué. Certains termes dans l'étiquetage d'aliments manufacturés peuvent contribuer aussi à la survenue d'accidents (ex épices, lactosérum, lysozyme, etc.).
Dans son analyse de 32 anaphylaxies alimentaires mortelles (Bock SA, *J Allergy Clin Immunol* 2001) Bock a montré que la plupart des réactions avaient été causées par l'ingestion accidentelle d'arachide ou de « tree-nuts » dans plus de 90 %, le lait et le poisson étant les autres aliments en cause. En Europe, la nouvelle législation de la Communauté Européenne a permis d'améliorer considérablement la lisibilité de l'étiquetage et d'inciter la mise en place des procédures de sécurité HACCP des industries agro-alimentaires appliquées non seulement à la maîtrise du risque microbiologique, mais aussi du risque allergénique (Huggett AC, *Allergy* 1998).

Les sources de contamination sont extrêmement variées. Les arômes par exemple, peuvent contenir divers allergènes potentiels (Taylor SL, *Can J Allergy Clin Immunol* 2000). Si le risque des huiles raffinées, blanchies, désodorisées, est controversé, en revanche les auteurs s'accordent sur le fait que certaines huiles comme les huiles pressées à froid peuvent être à risque chez des individus ayant un seuil réactogène bas. Le risque des lécithines -de soja ou d'œuf- a été soulevé (Palm M, *Allergy* 1999) et celui des amidons et des sirops de glucose de blé est en cours d'évaluation. L'allergénicité de la gélatine de poisson par exemple n'a pas été cliniquement prouvée -1 réaction subjective mineure notée chez 1 sujet sur 30 allergiques au poisson après test de provocation en double aveugle selon Hansen TK et al. (Hansen TK, *Food Chem Toxicol* 2004)- bien qu'une publication (Sakaguchi M, *J Allergy Clin Immunol* 2000) ait montré que quelques individus allergiques de poisson posséderaient des IgE liant à certaines protéines dans la gélatine de poisson. La gélatine de poisson n'est donc étiquetée que sous le terme « gélatine ».

Malgré des progrès incontestables concernant la législation sur l'étiquetage, la maîtrise du risque d'exposition aux allergènes alimentaires est incomplète notamment en raison d'exception à la règle d'étiquetage pour certaines productions artisanales. Le lupin par exemple, est un allergène alimentaire émergent dont l'utilisation industrielle s'est accrue sensiblement depuis environ 10 ans, en raison de ses qualités nutritionnelles et fonctionnelles. Cette Légumineuse est à l'origine d'anaphylaxies sévères observées le plus souvent chez des individus allergiques à l'arachide du fait de réactions croisées. La teneur en farine de lupin ajoutée à la farine de blé peut atteindre 10 %, alors que ces farines sont destinées à la fabrication de pain et gâteaux artisanaux, ne sont pas soumises à la réglementation sur l'étiquetage des allergènes (Moneret-Vautrin DA, *J Allergy Clin Immunol* 1999). D'autres Légumineuses telles que le pois blond -qui contrairement au soja, à l'arachide ou au lupin, ne font pas partie de la liste des 14 allergènes de déclaration obligatoire- sont retrouvées dans certaines charcuteries (saucisses, nuggets, cordons-bleus…) ; leur l'ingestion a déjà entrainé plusieurs accidents anaphylactiques.
Le risque lié à l'ingestion accidentelle de particules de latex se détachant des gants utilisés par les divers employés dans une chaine de fabrication de produit alimentaire est débattu. Une réaction allergique au jus d'orange contaminé par des particules de latex a déjà été publiée (TPO en double aveugle après manipulation avec des gants avec ou sans latex) (Franklin W. *N Engl J Med* 1999) Dans une autre étude, le transfert direct de protéine de latex au fromage a été visualisée en immunoblot après qu'un doigt de gant de latex ait touché le fromage. Ce risque de contamination a été également observé lors de la préparation de laitue (Beezhold DH, *Allergy Asthma Proc* 2000).

Le risque de transfert d'une protéine allergénique au cours du processus de production d'un aliment transgénique par ailleurs, n'est pas exclu (Moneret-Vautrin DA, *Rev Fr Allergol Immunol*

Clin 2006). Les produits alimentaires issus des progrès la biotechnologie agricole comme le maïs et le soja sont déjà commercialisés dans de nombreux pays, notamment aux USA.

La biotechnologie est la promesse de produire des végétaux aux propriétés agronomiques considérablement améliorées (résistance aux insectes, tolérance aux herbicides, résistance aux agents viraux et moisissures, tolérance climatique) et bien d'autres avantages (amélioration du goût et de la texture, de la durée de vie, des qualités nutritives). Ces produits sont notamment soumis à l'évaluation de leur risque allergénique potentiel avant commercialisation. L'allergénicité potentielle des protéines ou glycoprotéines provenant d'un aliment transgénique peut être évaluée en évaluant la source du gène, l'homologie de séquence et l'homologie 3D de la nouvelle protéine par rapport à des allergènes connus, le niveau d'expression de la nouvelle protéine dans l'aliment transgénique, sa classification fonctionnelle, sa réactivité en présence d'IgE spécifiques provenant d'individus allergiques, et en tenant compte des propriétés physicochimiques de la protéine nouvellement présentée (ex stabilité à la chaleur et au processus de la digestion). Une première charte originale des recommandations de screening du risque allergénique des OGM a été publié en 1996 (Metcalfe DD, *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996). L'OMS/FAO a édité un rapport structurant une stratégie de référence pour la détermination de non allergénicité complété par un article de référence de la commission du codex alimentarius (Codex Alimentarius Commission, 2003. Alinorm 03/34), de même que l'Autorité européenne de sécurité des aliments EFSA (Guidance document of the Scientific Panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, *EFSA J* 2004).

V-2 Méthodes de détection et quantification des traces d'allergènes dans les aliments

Plusieurs nouvelles méthodes détection et quantification ont été développées ces dernières années pour objectiver la présence éventuelle d'allergènes résiduels dans divers produits alimentaires. Ces essais ont été développés en raison d'un besoin grandissant au sein de l'industrie agro-alimentaire, de posséder des moyens fiables de garantir l'absence de contaminants dans les ingrédients bruts et leurs produits finaux. Le développement d'outils de détection spécifiques et sensibles permet à l'industrie alimentaire de protéger le consommateur allergique d'une part et d'autre part de pouvoir résoudre certains cas d'anaphylaxie lorsqu'une contamination d'un aliment par un allergène, est suspectée.
La détection des allergènes s'affronte à diverses difficultés. Ces tests doivent permettre la détection d'allergènes à l'état de traces et ce, quelque soit le type d'aliment en cause (aliment liquides, solides, tels que chocolat, gâteaux, diverses sauces, etc…..).
Pour déterminer le niveau de sensibilité exigée pour ces tests, il est nécessaire de préciser quel niveau de sécurité alimentaire notre société de consommation est en droit d'exiger des industriels : les produits alimentaires manufacturés doivent-ils assurer une garantie d'absence d'allergènes pour 90, 95 ou 99 % de la population ?
La dose seuil susceptible de déclencher une réaction clinique et varie effectivement, selon l'aliment en cause ainsi que l'individu.
Pour déterminer ces seuils de sécurité, il faut également préalablement établir les plus faibles doses d'allergènes capable d'induire une réaction clinique au sein d'un échantillon représentatif d'une population allergique à l'aliment étudié (LOAEL lowest observed adverse effect level) et le NOAEL théorique (non observed adverse effect level) par analogie avec les études de toxicologie. Ces seuils sont approchés par la réalisation des tests de provocation orale en double aveugle aux aliments étudiés, versus placebo au sein de l'échantillon (Taylor SL, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002). Un travail important a été pratiqué au sein de notre équipe pour

améliorer le seuil de réactivité des patients allergiques au lait de vache, à l'œuf, à l'arachide et au sésame notamment (Morisset M, et al. *Clin Exp Allergy*. 2003. Cf. annexe 3 et 4).
A la lumière des études cliniques, le seuil des tests de détection des aliments devrait se situer selon les auteurs et l'aliment en cause, **entre 1 et 100 ppm** (mg de protéine allergénique par kg d'aliment) (Koppelman J, *World of Ingredients* 1996/ Poms RE, *Food Additives and Contaminants* 2004).

V 2-1 Analyses biochimiques conventionnelles

Elles sont notamment utiles pour la mesure des teneurs en sulfites. Leur présence peut être détectée au dessus de 10 ppm (NF EN 1988-1; avril 1998. Produits alimentaires. Dosage des sulfites. Partie 1: méthode optimisée de Monier-Williams).
Chaque contaminant potentiellement responsable de réaction d'hypersensibilité alimentaire immunologique ou non, fait l'objet de techniques particulières selon sa nature comme par exemple une contamination par du Nickel (Larsen EH, *Food Addit Contam*. 2002). Ces techniques ne seront pas développées dans cette thèse.
La plupart des allergènes sont des protéines ou glycoprotéines dont l'allergénicité est objectivée par la mise en évidence d'une fixation d'IgE sérique provenant de sujets allergiques à un aliment donné. Une fois l'allergène identifié et caractérisé, celui-ci est administré à un animal (lapin, chèvre, rat….) afin de l'immuniser et de pouvoir récupérer des Ac en grande abondance, ces derniers étant utilisés dans divers tests de détection.
Plusieurs techniques de détection d'allergènes potentiels au sein de produits alimentaires ont été développées. Des méthodes de détection des traces d'arachide, de noisette (Holzhauser T, *J Agric Food Chem* 1999), d'œuf (Yeung JM, *J AOAC Int* 2000), de sésame (Brett GM, *Allergy* 1998) et d'amande (Hlywka JJ, *J Food Prot* 2000) ont notamment été publiées. Quelques études (Holzhauser T, *J Agric Food Chem* 1999/ Koppelman SJ, *J Immunol Methods* 1999; Hlywka JJ, *J Food Prot* 2000) concernant des produits alimentaires empaquetés, ont montré des résidus de fruits à coque non déclarés à des taux potentiellement dangereux pour des individus allergiques.
Ces techniques reposent soit sur la mise en évidence directe de l'allergène en cause, soit sur la détection d'un marqueur témoignant indirectement de sa présence (ex détection d'ADN).
La détection des protéines repose sur des tests radio-immunologiques (RAST ou radio-allergosorbent test)- ou des tests immuno-enzymatiques: EAST (enzyme allergosorbent test), RIE (rocket immuno-electrophoresis), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ou immunoblot.
Les RIE tests et immunoblot n'apportent qu'une appréciation qualitative ou semi-quantitative de la présence des allergènes tandis que les RAST, EAST et ELISA sont des tests quantitatifs. En routine, seuls les tests ELISA sont utilisés pour la détection des allergènes en raison de la précision des valeurs, de la simplicité du test et de sa reproductibilité.
Les méthodes basées sur la détection d'ADN consistent en l'amplification d'un fragment spécifique d'ADN par PCR (polymerase chain reaction). La real-time PCR (en temps réel) permet d'obtenir des mesures quantitatives tout à fait satisfaisantes et un seuil de détection très bas (quelques copies peuvent être détectées).
Le choix de la technique utilisée dépend de l'allergène à détecter : disponibilité de l'Ac et performances relatives (seuil de détection atteint).
Les résultats des techniques reposant sur la détection de l'ADN ne sont pas toujours comparables à celles reposant sur la détection des protéines car les processus de fabrication d'un aliment peuvent dénaturer de manière sensiblement différente les protéines en cause et leur ADN correspondant. Le dosage de l'ADN est une méthode controversée dans le sens ou l'allergène qu'on recherche correspondant à une protéine -dont l'allergénicité peut être modifiée au cours de la fabrication de l'aliment- et non pas à un ADN. L'ADN peut donc être présent en absence de l'allergène (qui a pu être éliminé par exemple pendant la fabrication de l'aliment) ou en présence de la protéine mais celle-ci peut avoir perdu son caractère allergisant après chauffage, par exemple.

V 2-1-a. RAST/EAST inhibition

Le RAST ou l'EAST sont des tests in vitro couramment utilisés en clinique pour mesurer dans le sérum de patients, la présence d'IgE spécifiques d'un allergène. Le RAST ou EAST inhibition reprennent ce principe pour la détection qualitative d'allergènes dans les aliments et apprécier leur allergènicité résiduelle. (Nordlee JA, *J Allergy Clin Immunol.* 1981/ Herian AM, *J Food Sci* 1993/ Wigotzki M, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001).
Quelques observations de détection d'allergènes masqués utilisant ce principe, ont été publiées (Frémont S, *Allergy* 1996/ Koppelman SJ, *J Immunol Methods* 1999), avec des limites de détection de l'ordre du 1 mg/kg.
Le test d'inhibition de RAST ou d'EAST repose sur la compétition de fixation des IgE vis-à-vis d'allergènes: dans un premier temps le sérum d'un patient -ou d'un pool de patients allergique(s) à un aliment donné et présentant un taux élevé d'IgE spécifiques-, est mis en présence de cet antigène alimentaire. Les IgE spécifiques se fixent donc sur l'allergène immobilisé en phase solide et après lavage, un Ac anti-IgE marqué est ensuite ajouté. Cet Ac est marqué par un radio-isotope (I^{125}) ou bien une enzyme (ex peroxydase) qui modifie la couleur du milieu lorsqu'on ajoute son substrat ou émet une longueur d'onde perceptible. La quantité d'IgE fixées est donc appréciée soit par compteur de rayonnement gamma (RAST) ou spectrophotomètre (EAST). Les mesures suivantes sont réalisées après incubation préalable du sérum en présence d'une quantité croissante d'un aliment suspect d'être contaminé par ce même allergène. En cas de contamination, certaines IgE spécifiques viendront se fixer sur l'aliment et on obtient ainsi une diminution progressive du nombre d'IgE fixées aux allergènes en phase solide, mesurées en RAST ou EAST.
Peu utilisée car utilisant des Ac dont la spécificité et l'affinité varient d'un individu à l'autre, cette technique est donc difficile à standardiser.

V 2-1-b. SDS-PAGE/ immunoblot

L'électrophorèse en une dimension de type SDS-PAGE ainsi que les immunoblots sont des méthodes standardisées de séparation et d'identification des protéines allergéniques. La chaleur et un agent réducteur dénaturent les protéines (dépolymérisation, rupture des ponts disulfure) et le SDS leur confère une importe charge négative.
Une bande correspond habituellement à une protéine unique, cependant, des protéines distinctes de PM identique migrent au même niveau. Les immunoblots utilisant des IgE humaines, permettent de détecter des contaminants alimentaires avec une limite de détection d'environ 5mg/kg (5ppm) (Scheibe B, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001).
Le désavantage majeur de cette technique est qu'elle est longue à mettre en place, et consommatrice d'IgE de patients allergiques, bien qu'il puisse être envisagé, une fois l'allergène bien caractérisé et purifié, d'utiliser des IgG d'animaux (lapins, chèvre..) préalablement immunisés.

V-2-1-c. Etude fonctionnelle cellulaire par mesure des médiateurs

Le test d'histaminolibération (HLL) est utilisé habituellement pour confirmer et quantifier l'allergénicité d'une protéine ou d'un médicament. Ce test repose sur une activation IgE dépendante de basophiles sanguins provenant de sujets allergiques, en présence d'allergènes (Cf. chapitre IV-2-2).

Après ajout de l'allergène, pour un individu donné, l'histaminolibération - mesurée en immunofluorescence ou radio-immunoassay - est proportionnelle à la concentration d'allergène spécifique, ce qui permet de quantifier la quantité d'allergène en présence et d'appliquer ce test à la détection d'allergènes dans les aliments. L'HLL est aussi sensible que le RAST et le résultat du test est obtenu en quelques heures. Ce test basé sur un prélèvement de sang frais provenant d'un sujet allergique et qui doit être « techniqué » dans l'heure suivante, est difficile à standardiser. Ce n'est donc pas un test de routine et il n'est effectué que dans quelques laboratoires spécialisés (Poms RE, *Food Addit Contam*. 2004).
La mesure de la libération de β-N-acetylhexosaminidase provenant de l'activation de mastocytes de rat, provenant de cultures de lignées immortalisées, est une alternative permettant de mesurer l'allergénicité potentielle d'un aliment comme cela a été démontré pour l'allergène majeur du soja, *Gly m Bd*, par Yamanishi (Yamanishi R, *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997).

V-2-1-d. Immunoélectrophorèse en roquette ou RIE

Cette technique utilise un gel pré-imbibé par un Ac. Les protéines étudiées migrent selon leurs propriétés électrophorétiques habituelles, mais en cas d'affinité avec l'Ac présent dans le gel, elles précipitent sous forme de complexes Ac-Ag. La précipitation et donc la formation de roquette, ne se produit que lorsqu'un ratio particulier Ag/Ac est atteint. La hauteur de la roquette reflète quant à elle, la quantité d'Ag. Le principe de la RIE (rocket immuno-electrophoresis) a été repris pour la détection d'allergènes dans divers aliments par Malmheden et Holzhauser (Etienne M, *J Agric Food Chem.* 2000/ Holzhauser D, *Z Lebensm-Unters Forsch A* 1998/ Yman IM, *J AOAC Int.* 2006) avec des limites de détection de 30 à 2.5 mg/ kg. Cette technique n'est pas une technique de routine en raison d'une préparation du gel et d'immuno-marquages laborieux.

V-2-2-e. Le Dot Blot (Dot immunoblotting)

Le Dot blot est une méthode simple peu onéreuse de screening de la présence d'allergènes dans divers aliments. Un extrait de protéines est déposé (spot) sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF puis incubé en présence d'un Ac marqué. En présence d'allergène spécifique de l'Ac marqué, les spots changent de couleur (immuno-marquage) ou bien impriment un film radiographique (immunoradio-marquage). La mesure de l'intensité du signal émis permet une évaluation semi-quantitative de la quantité d'allergènes présents avec une limite de détection de l'ordre de 2,5 mg/Kg (Blais BW, *J Food Prot.* 2001).
Le gros inconvénient du dot par rapport au WB, est qu'il n'y a pas de séparation des protéines et par conséquent, les Ac utilisés doivent être très spécifiques de la protéine qu'on cherche à mettre en évidence (on ne peut pas vérifier si la taille de la protéine révélée par l'Ac correspond effectivement à ce qu'on attend). Cette technique peut être responsable des tests de détection faussement positifs.

V-2-2-f. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Les tests ELISA font partie des techniques les plus utilisées pour détecter des contaminations par allergènes dans les laboratoires implantés dans les industries agro-alimentaires ou les agences de sécurité alimentaire. Les allergènes sont détectés en méthode immunoenzymatique et la quantité d'allergènes est appréciée par mesure colorimétrique, à une longueur d'onde donnée, en comparant les valeurs obtenues à une courbe étalon provenant de la mesure préalable de protéines standard purifiées à concentration connue.

Deux approches sont possibles pour la quantification des allergènes: **l'ELISA compétitif** et **l'ELISA sandwich**. Ce dernier test comporte un Ac dit « de capture » immobilisé sur une phase solide (microtitre plate ou multiple well strip). Les protéines spécifiques de l'échantillon sont alors captées par ce premier Ac et détectées ensuite par un second Ac marqué (marquage immuno-enzymatique). L'Ag est donc pris « en sanwich » entre les 2 Ac. La méthode Sandwich a été utilisée pour la détection de divers allergènes (Makinen-Kiljunen S, *Allergy* 1992/ Hlywka JJ, *J Food Prot.* 2000/ Tsuji H, *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995/ Holzhauser T, *J Agric Food Chem.* 1999/ Koppelman SJ, *Lancet.* 1999) et de nombreux tests commerciaux sont désormais disponibles. Le seuil de détection varie selon les kits et l'allergène recherché.

L'ELISA compétitif est plutôt utilisé pour la détection de petites quantités de protéines. Ce test utilise des Ag immobilisés en phase solide. On procède préalablement à l'incubation d'un sérum de sujet allergique avec un extrait de protéines étudiées à concentration croissante (inhibiteur) suspect de contenir l'allergène en cause. Le sérum est ensuite mis en contact avec la phase solide. Si l'échantillon testé ne contient aucun allergène, on observe la valeur maximale de la réaction immuno-enzymatique relative au sérum testé. L'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration de l'Ag dans l'échantillon testé.

Plusieurs auteurs ont utilisé la méthode ELISA compétitif pour la détection d'allergènes (Yeung JM, *J AOAC Int.* 1996. / Plebani A, *Clin Exp Allergy.* 1997/ Holzhauser T, *J Agric Food Chem* 1999/ Koppelman SJ, *J Immunol Methods* 1999/ Roux KH, *J Agric Food Chem.* 2001/ Werner MT, *J Agric Food Chem.* 2007). Le seuil de détection est autour de 0.4 mg/kg. Plusieurs kits commerciaux utilisant l'ELISA compétitif sont désormais disponibles pour certains allergènes.

Divers travaux de comparaison des seuils de détection et de la reproductibilité des résultats ont été publiés. Pour l'arachide, la comparaison de tous les kits commerciaux ELISA a montré que quelque soit les conditions de variabilité des techniques notamment lié à la matrice (van Hengel AJ. *Anal Bioanal Chem* 2007), les kits sont capables de détecter des traces d'arachide avec un seuil de détection d'au moins 5 mg/Kg de matrice alimentaire.

Une alternative au format ELISA a émergé depuis quelques années sous la forme de **bandelettes réactives.** Ces tests (**dipsticks**) sont peu couteux, rapides, transportables, et de réalisation simple car ne requérant aucun matériel supplémentaire. Ils n'offrent néanmoins que des résultats qualitatifs. Baumgartner et al. (Baumgartner S, *European Food Research and Technology* 2002) ont développé un système à bandelettes pour la détection de protéines d'œuf de spécificité et sensibilité tout à fait satisfaisantes. Une étude a comparé deux types de bandelettes pour la détection de l'arachide auprès de 18 laboratoires. Ces bandelettes sont capables de détecter des traces d'arachide avec un seuil de détection < 21 mg /Kg (van Hengel AJ, *J AOAC Int* 2006)

En conclusion, il est nécessaire d'insister sur le fait que bien que les méthodes de détection des traces d'allergènes puissent être très sensibles, si la méthode de préparation et extraction des protéines est mauvaise, les résultats seront faussement négatifs. La présence de tannins dans les chocolats par exemple, peut entraîner certaines interférences et perturber considérablement la qualité des tests de détection comme l'ont montré van Hengel et al. lors d'une étude comparant les résultats inter-labos portant sur la détection de protéines d'arachide dans des cookies (van Hengel AJ, et al. *J AOAC Int.* 2006).

V-2-2-g. La méthode PCR ou réaction en chaîne par polymérase

Les méthodes de détection des allergènes reposant sur la détection indirecte de leur ADN correspondant font l'objet de développements récents ciblant les industriels, reprenant le principe de la détection de contamination microbienne ou par OGM (Hubner P, *J AOAC Int.* 2001).

La polymerase chain reaction (PCR), mise au point en 1985 par Karry Mullis, est une méthode très spécifique et suffisamment sensible pour être appliquée à la détection d'allergènes.

La PCR permet in vitro d'amplifier le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN même si la quantité initiale est très faible (jusqu'à une copie). La PCR utilise la propriété des ADN

polymérases de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce. Cette technique impose de connaître la séquence de 2 régions délimitant le segment d'ADN à amplifier. Au fil des cycles, la quantité d'amplicons augmente de façon exponentielle et on obtient, en théorie 2n copies après n cycles. Dans la pratique, pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produit environ 10^6 copies (amplicons de taille attendue).
Le produit de l'amplification peut être révélé, après électrophorèse en gel d'agarose, par addition de **bromure d'ethidium (BEt),** produit intercalant. Une fois intercalée, cette molécule présente une fluorescence orange sous illumination par UV à 300 nm.
Les produits de la réplication de l'ADN peuvent être également analysés en **méthode Southern**. Cette technique nécessite préalablement une électrophorèse de fragments d'ADN ayant préalablement subit une digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction. Le gel d'agarose est ensuite dénaturé pour obtenir des ADN simple brin qui seront transférés sur une membrane de nylon ou nitrocellulose. Les ADN simple brin sont fixés par cuisson ou action des UV sur la membrane destinée à être hybridée avec une sonde spécifique. Apres lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non fixé, un film est appliqué sur la membrane. Une ou plusieurs bandes radioactives pourront ainsi être décelées, correspondant aux fragments d'ADN recherché.
La PCR ne donne que des résultats qualitatifs mais en incorporant des standards internes, on peut obtenir des mesures semi-quantitatives.

Une meilleure appréciation quantitative est désormais offerte avec la **PCR en temps réel** (real-time PCR) ou la **PCR-ELISA**.
Au cours de la PCR en temps réel **(RTPCR),** la réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique c'est-à-dire dénaturation, hybridation, extension. La PCR classique amplifie une séquence spécifique d'ADN dont les produits sont objectivés sur gel d'agarose, mais elle ne permet pas leur quantification exacte. La RTPCR utilise une sonde fluorescente et mesure la fluorescence émise durant la réaction comme un indicateur de la quantité d'amplicons produit à chaque cycle (en temps réel) à l'opposé de la PCR classique qui détecte les produits d'amplification en fin de réaction **(endpoint detection)**. On obtient ainsi avec la RTPCR, une quantification absolue (détermination en nombre de copies) par rapport à un standard externe.
L'équipement pour RTPCR comporte une machine à PCR, un dispositif pour émission lumineuse et lecture de fluorescence et un ordinateur pour l'analyse des résultats. Cet équipement plus couteux permet en revanche, d'obtenir des résultats plus rapides (en 30 mn à 2 h), sensibles et reproductibles avec une quantification précise (détection de quelques ng d'ADNc).
Lorsqu'on observe la cinétique de production des réplicons au cours du temps, on constate que seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales de fragments d'ADN amplifié. C'est durant cette phase que la RTPCR collectionne les données.
Au cours de la phase linéaire, on observe un ralentissement de l'amplification et à la phase plateau -zone de détection de la PCR traditionnelle- la réaction est arrêtée et les produits de la réaction commencent à se dégrader.
En RTPCR, l'intégralité de la cinétique mesurable (au-dessus du bruit de fond) est quantifiée. Les données de fluorescence sont exprimées en logarithme afin d'étudier plus facilement la phase exponentielle qui prend alors une apparence linéaire. Cette partie, alors appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initial.
Holzhauser et al. ont comparé un kit commercial de PCR-ELISA avec une méthode sandwich ELISA pour la détection des allergènes de la noisette dans les aliments. Les deux méthodes ont un seuil de détection inferieur à 10 ppm mais au seuil de 10 ppm il semble y avoir moins de faux positifs liés à des réactivités croisées non spécifique, avec la technique PCR-ELISA. Sur 27 produits alimentaires, la PCR-ELISA n'a présenté qu'un faux-négatif, correspondant à une contamination < 1 ppm. (Holzhauser T. *J Agric Food Chem*. 2002).

V-2-2-h. Les Biosenseurs

Cette autre technologie émergente n'est pas encore couramment appliquée à l'analyse des contaminants alimentaires mais c'est une méthode très prometteuse car elle peut faire l'objet de développement de microarray (chip). Les instruments utilisés permettent d'évaluer une interaction moléculaire spécifique en temps réel. Apres avoir immobilisé au niveau d'une lame par exemple, la molécule cible (un Ac, une protéine ou un fragment de DNA simple brin), le résultat de l'interaction avec un biosenseur peut être mesuré. Cette technique s'affranchit du classique marquage des molécules cibles avec des substances fluorescentes ou radioactives, la réaction pouvant être quantifiée par une mesure du changement de l'indice de réfraction par exemple. Cette technologie offrirait certains avantages : temps d'analyse raccourcis et haut degré d'automatisation. Le principe des biosenseurs a déjà été utilisé pour la détection de traces de protéines de noisette, d'œuf et de lait. La détection de protéines de lait a fait l'objet de plusieurs publications (Dupont D, *J AOAC Int.* 2006/ Indyk HE, *J Agric Food Chem*. 2004). Les biosenseurs utilisant le principe de la SPR (Surface plasmon resonance) sont capables de détecter des traces de protéines en dessous des seuils de 1–12.5 µg/g d'aliment. Ils atteindraient ainsi les seuils de détection des méthodes ELISA (Malmheden Yman I, *J AOAC Int* 2006).

Puces à ADN ou Protéines

Des tests de détection de plusieurs allergènes au cours d'une même analyse émergent depuis quelques années. Il s'agit d'une technique prometteuse relevant de technologies en plein essor. (Malmheden-Yman I, *J AOAC* Int. 2006).

La spectrométrie de masse couplée à l'HPLC

La spectrometrie de masse (SM) couplée à l'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) n'est pas une technique de routine mais en revanche, elle offre une très haute spécificité. En effet, les protéines allergéniques peuvent subir des modifications au cours de différents procédés industriels qui peuvent modifier leurs immunogènicité. La SM couplée à l'HPLC permet de détecter sans ambigüité des peptides en fonction de leur masse spectrale spécifique qui reste inchangée. Ces méthodes ont été utilisées pour la détection de l'arachide (Shefcheck KJ, *J Agric Food Chem.* 2006) et des PLV (Weber D, *J Agric Food Chem* 2006) dans différentes matrices alimentaires. Cette technique qui nécessite certes un investissement couteux, peut en revanche objectiver la présence de plusieurs allergènes dans une matrice alimentaire, au cours d'une même analyse (Chassaigne H, *J Agric Food Chem*. 2007).

TRAVAIL PERSONNEL

Cette partie regroupe différents études cliniques ou clinico-biologiques qui sont l'illustration des des méthodes diagnostiques de l'allergie alimentaire et de l'évaluation de l'allergénicité des aliments qui ont été abordes dans l'introduction.
Ces travaux -publiés, soumis ou en préparation- ont toujours pour point de départ, une interrogation clinique car ils sont générés avant tout par une équipe de chercheurs cliniciens. Cette interrogation aboutit parfois à une meilleure identification des caractéristiques cliniques et épidémiologiques d'une allergie alimentaire particulière, comme cela est objectivé avec l'étude des seuils de réactivité.
Certaines études partant parfois d'observations cliniques très singulières, ont été menées en collaboration avec divers biologistes dans le but d'améliorer le diagnostic et/ou la prévention de l'allergie alimentaire: amélioration du diagnostic de l'allergie alimentaire avec le développement des allergènes recombinants d'arachide, détection de traces d'allergènes alimentaires variés dans des médicaments ou des aliments diététiques incriminés dans la survenue d'anaphylaxie.
Ces travaux ont été menés au sein du département de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de Nancy en collaboration avec laboratoire MTM qui héberge l'équipe de recherche EA3999 Allergic Diseases: Diagnosis and Therapeutics, dirigée par le Pr Kanny.

I MATERIELS et METHODES

I-1 DETERMINATION DES SEUILS DE REACTIVITE AUX ALIMENTS

Comme cela a été évoqué dans le chapitre V, de nombreux tests de détection ont été développés depuis plus de 10 ans pour répondre à la nécessité d'objectiver la présence d'allergènes résiduels dans les produits alimentaires manufacturés. Ces essais ont été développés en raison d'un besoin grandissant au sein de l'industrie agro-alimentaire d'assurer la sécurité des consommateurs face à un nombre croissant d'anaphylaxie alimentaire graves et la mise en place d'une législation internationale de plus en plus stricte, sur l'étiquetage des aliments.
Pour déterminer le niveau de sensibilité des tests de détection que les consommateurs seraient en droit d'exiger, il est nécessaire préalablement d'identifier les doses seuils d'aliments susceptibles de déclencher une réaction clinique au sein d'une population souffrant d'allergie alimentaire.

Deux études ont été menées dans le service de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de Nancy. Elles contribuent largement à l'avancée des connaissances dans ce domaine.
Cf. annexe 3. Publication sur les seuils de réactivité à l'œuf, le lait, l'arachide et au sésame **Morisset M,** et al. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges.*Clin Exp Allergy*. 2003; 33(8): 1046-51.
Cf. annexe 4, article soumis sur l'évolution de l'allergénicité des huiles d'arachide.
Morisset M. et al. **Assessment of the potential risk of peanut oil in peanut-allergic children Risk assessment of peanut oil allergy.** *Pediatric All Immunol.*

L'étude des NOAEL à l'archide correspond à un besoin ressenti par le législateur et les industriels de connaître le seuil exact de réactivité le plus bas au sein d'une population de sujets allergiques afin de permettre de déterminer le niveau de détection que les associations de consommateurs et les responsables de la santé publique seraient en droit d'exiger pour assurer la pleine sécurité des

sujets allergiques (Communication orale personnelle sur les variations des seuils de reactivité, 5th workshop on Food allergens. Halifax, Canada Mai 2008).
Afin de déterminer le niveau de sécurité exigible pour la détection des allergènes dans les aliments, il est indispensable de déterminer la quantité d'allergènes tolérée par un sujet allergique. Les seuils de réactivité variant d'un sujet à l'autre (Morisset M, et al. *Clin Exp Allergy*. 2003), il est nécessaire d'étudier cette réactivité chez un très grand nombre d'individus et d'étudier les seuils de réactivité chez les individus les plus réactifs vis-à-vis de l'allergène alimentaire étudié. La plus petite dose d'allergène susceptible d'induire une réaction modérée après absorption de l'allergène correspond au LOAEL ou lowest observed adverse effect level (Taylor SL, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002). Par analogie avec les études effectuées en toxicologie (Crump KS. *Fund. Appl. Toxicol*. 1984), la détermination des plus petits seuils de réactivité permet d'approcher la notion de NOAEL (no-observed adverse effect level). Appliquée à l'AA à l'arachide, elle correspond à la quantité la plus élevée d'arachide susceptible d'être tolérée par l'ensemble des patients allergiques. Cette valeur est une valeur théorique sur laquelle on s'appuie pour déterminer les niveaux exigés pour les procédures de réduction des contaminants dans l'industrie agro-alimentaire et la détermination de seuils de détection des tests utilisés à cet escient. Pour approcher cette valeur, nous avons étudié le LOAEL à l'arachide au cours d'une étude prospective par test de provocation orale à l'arachide, chez des sujets adressés pour allergie à l'arachide.

Détermination du LOAEL et NOAEL dans l'allergie à l'arachide

Patients : Tout patient adressé en hospitalisation pour bilan d'allergie à l'arachide a été inclus de manière consécutive sur une période de 12 mois, après signature d'un consentement éclairé par le proposant majeur ou ses parents, pour les patients mineurs.
La présélection des patients est basée au départ sur une histoire clinique rapportant de manière non équivoque la survenue de manifestations allergiques à type d'urticaire (U), AO, asthme (A) ou choc anaphylactique (CA) moins d'une heure après exposition à l'arachide, avec prick-tests et IgE spécifiques positifs à l'arachide. Les sujets sont finalement retenus s'ils correspondent à l'une des deux situations suivantes :
- Histoire clinique mettant en jeu une manifestation allergique immédiate après ingestion d'arachide, avec prick-tests positifs à l'arachide et IgE à l'arachide > 15 kU/l (Sampson HA. *J Allergy Clin Immunol* 2001) ou
- Histoire clinique mettant en jeu une manifestation allergique immédiate après ingestion d'arachide, avec prick-tests et IgE positifs à l'arachide ainsi qu'un test de provocation orale en double aveugle positif à l'arachide.

Tests cutanés: chaque patient inclus dans l'étude a bénéficié d'un prick-in-prick test (PT) avec de l'arachide naturelle grillée, d'un prick-test avec un témoin négatif (sérum physiologique) et un témoin positif (sulfate de codéine à 9%) selon la méthode précédemment publiée par Dreborg (Dreborg S. *Allergy Proc* 1991).

Mesure des IgE spécifiques : chaque patient inclus dans l'étude a bénéficié d'un dosage d'IgE à l'arachide par méthode ImmunoCap (laboratoire Phadia, Uppsala, Suède).

Test de provocation orale:
les tests ont été pratiqués en double aveugle versus placebo (DBPCFC) à 24h d'intervalle, avec une randomisation au hasard du jour où l'arachide est administrée. La méthodologie suit les procédures précédemment publiées (Moneret-Vautrin DA, et al. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000). L'arachide est ingérée sous forme d'arachide native grillée en poudre. Le placebo est

composé de compote de pomme auquel on a ajouté des Cracform® à base de mais et de riz. Afin d'optimaliser la procédure en double aveugle, le patient porte un pince-nez avant d'ingèrer la dose puis se rince la bouche avec une gorgée d'eau qu'il avale, avant d'ôter le pince-nez.
Chaque dose est administrée toutes les 20 mn, avec une première progression **100 µg- 300µg- 1 mg- 3 mg- 10 mg- 30 mg.** Ces quantités d'arachide ont été mesurées sur une balance d'ultra précision : AG 135 Mettler Toledo.
En l'absence de réaction clinique après ce premier test de provocation orale (TPO), le patient est reconvoqué pour tester l'arachide à dose supérieure en suivant éventuellement une troisième progression, jusqu'à une dose cumulée de 10 g d'arachide, selon une procédure précédemment publiée (Moneret-Vautrin DA, et al. *Clin Exp Allergy*. 1998).
Au cours de ce test, tous les signes objectifs et subjectifs sont notés. On ne tient compte des signes subjectifs qui si la dose suivante entraîne également des manifestations subjectives et/ou objectives.
Le TPO est considéré comme positif s'il s'accompagne de manifestations objectives cutané-muqueuses à type d'urticaire, angioedème (AO), poussée d'eczéma, rash ou conjonctivite aigue. Parmi les signes respiratoires, on retient la rhinite aigue allergique, la toux, les sibilants, une baisse significative du DEP ou du VEMS. Les vomissements et débâcles diarrhéiques sont des signes également pris en considération. Les douleurs abdominales sont des signes subjectifs qui lorsqu'ils sont observés avec deux doses successives, sont suffisants pour considérer le test comme positif (notre expérience a montré qu'on expose le patient à des manifestations sévères lorsque le TPO est poursuivi à des doses supérieures, ce qui n'est pas éthiquement défendable).

I-2 Synthèse d'allergènes recombinants: implications dans le diagnostic in vitro et in vivo de l'allergie à l'arachide.

Améliorer le diagnostic de l'allergie de l'arachide en utilisant les allergènes recombinants est une autre approche de l'allergenicité des aliments, notamment en objectivant le spectre de réactivité des sujets allergiques vis-à-vis des différentes protéines. Ce travail passe nécessairement par un travail de recherche clinique minutieux afin de sélectionner de nombreux individus dont l'allergie doit être confirmée selon les critères développés dans le chapitre I-2.

Cette étude s'insère dans le cadre des travaux d'envergure internationale qui contribuent à améliorer le diagnostic in vivo et in vitro de l'allergie alimentaire par le développement des principaux allergènes recombinants des aliments responsables d'anaphylaxies sévères.
Ces travaux ont été menés au sein du département de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de Nancy et du laboratoire MTM qui héberge l'équipe de recherche EA3999 Allergic Diseases: Diagnosis and Therapeutics, dirigée par le Pr Kanny d'une part et les chercheurs de la société Genclis qui ont synthétisé et purifié les protéines recombinantes d'arachide, d'autre part.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (cf annexe 5): Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, Ogier V, Petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks AW, Bihain B, Sampson HA, Kanny G. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1): 250-6.

Matériel et méthodes : Cf annexe 5

I- 3 Détection de traces d'allergènes dans les aliments

Les études des seuils de réactivité aux aliments, les études portant sur l'amélioration du diagnostic de l'allergie alimentaire ont tous été motivés au départ par des préoccupations cliniques. La compréhension d'accidents anaphylactiques survenus chez des patients adressés dans le service de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de Nancy et la prévention secondaire qui en découle, ont motivé les études clinico-biologiques suivantes.
Ainsi, l'identification des traces d'allergènes dans les aliments responsables d'accidents anaphylactiques représente un autre aspect important de l'évaluation de l'allergénicité des protéines alimentaires.

I-3-1 Protéines de lait de vache dans un biscuit diététique garanti sans lait.

Deux familles ont rapporté des réactions anaphylactiques de survenue immédiate après consommation isolée d'un même petit gâteau (biscuit Valpiform®, nappé de chocolat) garanti sans lait, sans œuf et sans gluten, chez deux enfants suivis pour APLV sévère. Il nous a semblé important de s'assurer que ces gâteaux hypoallergéniques n'étaient pas contaminés par des protéines de lait, afin de prévenir d'autres accidents chez d'autres patients souffrant aussi d'allergie alimentaire et auxquels nous recommandions habituellement ce produit.
En raison d'antécédent d'allergie à des traces de lait chez ces deux enfants, la recherche de protéines de lait s'est focalisée dans un premier temps, en toute logique, sur la mise en évidence de protéines de lait de vache, bien que d'autres allergènes alimentaires puissent être potentiellement impliqués.

Première observation:
Un garçon, suivi dans le service de Médecine Interne et Immunologie Clinique du CHU de Nancy depuis la petite enfance, est revu à 3 ans en raison d'un épisode d'œdème de la face et d'une urticaire en juillet 2002 quelques minutes après avoir ingéré environ 1/8eme d'un biscuit Valpiform nappé de chocolat et garanti sans lait, sans œuf et sans gluten (société Valpiform, Compiègne, France).
Cet enfant a présenté une dermatite atopique (DA) dès le premier mois de vie. Une urticaire généralisée accompagnée d'angioedème de la face avec malaise à 5 mois après avoir consommé un "*petit suisse*", ont motivé la réalisation du premier bilan allergologique. La DA a guéri après éviction stricte du lait de vache et sevrage de l'allaitement maternel. A l'âge d'un an, une urticaire a été observée à la consommation d'œuf mais l'œuf a pu être réintroduit avec succès à l'âge de 2 ans et demi. L'APLV est toujours évolutive en juillet 2002, puisque un mois auparavant, l'enfant a présenté une urticaire et un œdème labial après avoir été léché par des chiots qui venaient de consommer du lait. Cette allergie par procuration laisse supposer la persistance d'une APLV avec un seuil réactogène bas.

2eme observation:
Un jeune garçon de 3 ans atteint de mucoviscidose est suivi pour une APLV évoluant dans un contexte d'allergie alimentaire multiple. Une DA apparue à 4 mois a motivé un premier bilan allergologique objectivant une sensibilisation multiple au lait, œuf, poisson et gluten. A l'éviction de ces aliments, la dermatite atopique a guéri. L'APLV a été confirmée par un test de réintroduction du lait : malaise déclenché après ingestion d'une dose cumulée de 8 ml de lait. L'APLV persiste puisque les parents rapportent une urticaire par procuration après avoir été embrassé par un adulte qui avait ingéré auparavant des produits laitiers. Une allergie IgE-dépendante évolutive à l'œuf et au blé a par ailleurs été objectivée par des PT positifs au gluten (7

mm) et au blanc d'œuf (3,5 mm), la présence d'IgE spécifiques au gluten (8 kU/l) et à l'œuf (0,86 kU/l) et des TPO positifs : AO du visage après ingestion d'une dose cumulée (DC) de 965 mg de blanc d'œuf cuit, urticaire après ingestion d'une DC de 265 mg de farine de blé.
Les parents rapportent un AO s'accompagnant de dyspnée de survenue immédiate après consommation du même biscuit nappé chocolat (un gâteau entier).

Ce gâteau est un *biscuit sablé* fabriqué dans une usine française spécialisée dans la fabrication de produits « allergen-free » (société Valpiform, Compiègne, France). Il s'agit d'un biscuit recouvert d'une nappe de chocolat et garanti sans œuf, lait ou gluten. Le gâteau selon l'étiquetage, est composé d'amidon de maïs, d'huile de palme, de sucre, de sirop de glucose, de noix de coco râpée, de lécithine de soja, de vanille, de carbonate de calcium, de caramel et de caroténoïde. La couche de chocolat (20%) contient du sucre, de la pâte de cacao, de la lécithine de soja et une vanille de synthèse.
Les biscuits en cause dans la première et la deuxième observation ne proviennent probablement pas du même lot car ces réactions sont survenues à plus de deux ans d'écart.

Matériel et méthodes

Tests cutanés

Des prick-in-prick-tests (PT) ont été réalisés avec de la poudre de lait (formule infantile O-LAC, laboratoire Mead Johnson), la couche chocolatée du biscuit et la face non chocolatée ainsi qu'une poudre de chocolat provenant d'un autre fournisseur, garantie sans lait (poudre de chocolat amer Van Houten). Ces prick-in prick-tests ont été réalisés conformément aux publications antérieures (Dreborg S. *Allergy Proc* 1991).
Dans la première observation, les tests cutanés ont été réalisés en janvier 2003. Les PT et les TPO ultérieurs sont effectués avec le même lot (lot B). Cependant, la probabilité que ce biscuit utilisé pour les tests provienne du lot (lot A) qui a induit l'accident 6 mois auparavant et acheté dans un magasin du sud-ouest de la France, est peu probable. Nous n'avons pas pu récupérer le paquet de biscuit en cause, les parents l'ayant immédiatement jeté à la poubelle et oublié de noter le numéro de lot. Dans la deuxième observation, les PT ont été effectués avec un gâteau provenant du même lot (lot C) que celui qui avait déclenché des manifestations allergiques quelques semaines plus tôt.
Suite à l'incident avec le biscuit chocolaté chez le premier enfant, une sensibilisation au chocolat Valpiform a été secondairement étudiée de manière prospective et consécutive par PT chez 29 patients présentant une APLV certaine IgE-dépendante. De manière consécutive, un 4eme lot (lot D) de chocolat (barre de chocolat) provenant du même fabricant a été testé afin de déterminer si la sensibilisation objectivée chez les deux enfants précédemment étudiés témoignait d'un seuil de réactivité particulièrement bas.

IgE spécifiques

Des IgE spécifiques au lait de vache et cacao ont été mesurées en Cap-System (Pharmacia, Uppsala, Suède).

Test de provocation orale: ingestion d'une poudre de chocolat Van'Houten® (Kraft Foods Worldwide Corporate Headquarters: Three Lakes Drive Northfield, IL 60093 USA) diluée dans un substitut de lait (Neocate® SHS International Liverpool United Kingdom) afin de prouver l'absence d'allergie au chocolat.

RAST inhibition du lait

Une inhibition du RAST au lait par le chocolat provenant du gâteau a été réalisée afin de prouver l'existence d'une contamination du chocolat par des protéines de lait de vache. Le chocolat étudié

provient du lot B utilisé pour les PT dans l'observation N^{0}1. Nous avons utilisé un pool de sera provenant de patients ayant une APLV certaine ainsi qu'un taux d'IgE anti-lait très élevé > 100kU/l.
La poudre d'un lait commercial a préalablement été réhydratée en mélangeant 30 ml d'eau distillée à 4300 mg de poudre. Le chocolat a été récupéré en grattant la couche très superficielle du biscuit.
Les RAST inhibition ont été réalisés avec le matériel Pharmacia CAP system et suivant la même méthode que celle qui avait été utilisée par Fremont et al. pour la détection de PLV dans une farine infantile dite « sans lait » (*Frémont, Allergy 1996*). L'inhibition du RAST au lait a été pratiquée avec un lait réhydraté dont les concentrations en protéines sont comprises entre 3,55 g/l et 3,55 µg/l (7 concentrations), et avec le chocolat à des concentrations allant de 250 à 25 mg/ml (10 concentrations). On pratique une incubation du pool de sera provenant de sujets ayant une APLV avec des concentrations décroissante de lait ou chocolat (25 µl de sérum mélangé à 25 µl de lait ou de chocolat à diverses concentrations). L'incubation dure 30 mn sous agitation constante. Un mélange contrôle est également incubé: 25 µL de sérum mélangé à 25 µL de tampon phosphate. Un RAST est effectué pour chaque concentration en double. Le pourcentage d'inhibition correspond au ratio:
1- (cpm mesurés avec sera incubé avec lait ou chocolat / cpm mesurés avec sera incubé avec contrôle).

SDS-PAGE et Immunoblot
Préparation de l'extrait de chocolat (chocolat dans PBS 5 g/10 ml à pH 7,4) incubé à 37 °C pendant 30 mn puis à 55-60 °C pendant 2 h puis centrifugation à température ambiante 4500 rpm puis centrifugation à 10000 g 15 mn à température ambiante provenant du grattage de la couche chocolatée du biscuit. Deux lots (lot 1102 correspondant au lot C et lot 0404) ont été testés.
Analyse en SDS-PAGE en condition dénaturante et réductrice sur Gel Invitrogen Nupage 12% bis-Tris gel, Invoitrogen, Carslbad USA. Dépôt d'un mélange 2/1 vv dans SB2x.
La séparation des protéines a été objectivée par une coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent (kit SilverSNAP stain, Pierce, Rockford, Illinois)
Différents volumes d'extrait de chocolat ont été déposés par puits. Les marqueurs de PM See Blue Plus 2 prestained standard et magic mark XP (Invitrogen, USA) ont été utilisés.
Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF Biorad. La membrane a été saturée dans une solution TBST (Tris buffered saline with Tween) (Tris 0.1M, pH 7,5, 0.15 M NaCl et 0.1% Tween) contenant 1% de gélatine de poisson (solution de blocage, Sigma). La membrane est ensuite incubée pendant une nuit avec le sérum de deux patients ayant une APLV certaine et dont les IgE spécifiques au lait sont supérieurs à 100 kU/l.
Apres lavage, la membrane est ensuite incubée avec un Ac IgG de chèvre anti-IgE humaine (Kirkegaard & Perry laboratories Gaithersburg.USA) conjuguée à la peroxydase (HRP) diluée au 1/10.000 pendant une heure.
Les protéines reconnues par les IgE des patients sont révélées par chimiluminescence (ECL plus Westernblotting kit. Amersham biosciences).

Inhibition d'immunoblot
Pré-incubation du sérum avec soit des protéines de lait provenant d'un lait ½ écrème Regilait à dose progressivement décroissante 1 mg, 0.1 et 0.01 mg, ou soit avec de la β-lactoglobuline (βLG) purifiée d'origine commerciale (laboratoire Sigma).

I- 3-2 Détection de traces de protéines de lait de vache dans les probiotiques

Ce travail a fait l'objet de deux publications internationales consultables en annexe 6 et 7 concernant la mise en évidence de contamination par des protéines de lait de vache (PLV) dans certains probiotiques commercialisés en France, responsables d'anaphylaxie chez des sujets allergiques aux protéines de lait de vache.

Moneret-Vautrin DA, **Morisset M**, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy* 2006; 61(4): 507-8

Tiger Lee TT, **Morisset M**, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, Codreanu F, Bihain BE, Kanny G. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 119(3):746-7

Matériel et méthode :

Cf annexe 6 et 7

I- 3-3 Détection de protéines de lait de vache dans le lactose

Cf. annexe 8, poster Morisset M, Astier C, Codreanu F, Cordebar V, Commun N, Kanny G, Moneret-Vautrin DA. "Allergy to cow milk proteins contaminating lactose, common excipient of dry powder inhalers for asthma. An original masked food allergy clinical case. *Congres de l'EFIM, European Federation of Internal Medicine. Paris septembre 2005.*

Le lactose est un disaccharide du lait, composé de glucose et galactose unis par une liaison β rompue par une enzyme intestinale: la lactase (ou galactosidase). Le lait de vache en contient environ 50 g /l et le lait maternel environ 70 g/l.
Le lactose issu du lactosérum, est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. En 2002, 33929 tonnes ont été produites en France.
Le lactose pharmaceutique est un excipient à effet notoire. Sa présence dans une spécialité pharmaceutique entraîne une contre-indication chez les sujets présentant une galactosémie ou un déficit en lactase. Chez les sujets présentant une APLV sévère, l'éviction du lactose est habituellement recommandée, en raison de la présence éventuelle de PLV à l'état de traces. L'hypothèse d'une contamination du lactose par des PLV et le risque anaphylactique attribué à l'ingestion de lactose chez des sujets ayant une APLV, ont été déjà démontrés dans le passé (Frémont S et al. *Allergy* 1996).
Nous rapportons une observation singulière de bronchospasme associé à un eczéma après exposition par voie respiratoire à des PLV sous forme masquée, lors de l'inhalation d'un broncho-dilatateur délivré sous forme de poudre de lactose, chez un adulte souffrant d'APLV.

Histoire clinique :

Une femme de 41 ans suivie depuis 1985 pour un asthme est revue en 1995 en raison de l'apparition secondaire d'eczéma, d'urticaire de contact au latex, d'un angioedème lors de l'ingestion de blanc d'œuf et de bronchospasme lors de la préparation d'omelette.
En dépit de l'éviction de l'œuf, la persistance d'eczéma et l'apparition de douleurs abdominales associées à des diarrhées, ont motivé la poursuite du bilan allergologique qui objective en 2001, une sensibilisation aux viandes et au lait. Sous régime d'éviction de l'œuf, du lait et des viandes peu cuites, les symptômes digestifs disparaissent et l'eczéma ainsi que l'asthme s'améliorent.

Cette patiente qui exerce le métier d'aide soignante à domicile, présente une allergie aux protéines animales entretenue voire déclenchée par une exposition privée et professionnelle aux épithélia de chat, chien, cochon d'inde et aux oiseaux de compagnie (bengali, rossignols) (Drouet M, *Monogr Allergy* 1996/ de Maat-Bleeker F, van Dijk AG, Berrens L. *Ann Allergy* 1985).
En 2002, la patiente rapporte une nouvelle poussée d'eczéma et des accès de dyspnée avec toux. Ces manifestations sont apparues lorsque le β2 mimétique à courte durée d'action administré sous forme de spray a été remplacé par du formotérol à longue durée d'action, inhalé sous forme de poudre (Foradil® Novartis).
En 2003, la patiente rapporte la survenue d'une crise d'asthme lors de la cuisson d'un lapin au four, dès l'ajout de crème fraîche évocatrice d'un asthme déclenché par l'inhalation de PLV.

Méthodes

Tests cutanés

Des PT ont été réalisés pour les principaux pneumallergènes (*D. pteronyssinus*, *Alternaria alternata*, blatte, chat, chien, mélange pollens de graminées, pollen de bouleau, pollen de frêne, pollen de plantain, pollen d'armoise, latex) avec des extraits commerciaux (laboratoire Allerbio. Varennes en Argonne, France). Les témoins positif et négatifs utilisés pour controler la réactivité cutanée correspondent respectivement au sulfate de codéine à 9% et au NaCl 9°/°°.
Des PT ont été réalisés avec les 30 principaux aliments natifs comprenant notamment toutes les viandes crues : lait (lait O-Lac, laboratoire Mead Johnson), œuf, farine de blé, seigle, noisette, arachide, moutarde, céleri, carotte, pomme de terre, banane, avocat, kiwi, levure de boulanger, morue, thon, soja, lentille, lupin, crevette, crabe, sésame, sarrasin, viandes de bœuf, poulet, dinde, porc, agneau et lapin ; selon une méthode précédemment publiée (Dreborg S. *Allergy Proc* 1991)
Des PT ont été pratiqués également avec la poudre de Foradil® contenu dans la gélule et du lactose de qualité pharmaceutique utilise ultérieurement pour le TPO et le test de provocation bronchique (laboratoire Cooper. Melun. France. Lot N° 00090354).

IgE spécifiques

Les IgE au lait de vache, α-lactalbumine, β-lactoglobuline, caséine, sérum albumine bovine et œuf ont été analysées par Cap System™ (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suède).

Tests de provocation:

Les tests de provocation ont été réalisés en double aveugle avec le consentement éclairé et signé de la patiente.

Test de provocation orale

Le TPO au lait se déroule sur deux jours avec ingestion de doses progressivement croissantes toutes les 20 mn, d'une formule infantile lactée dépourvue de lactose O Lac® (Mead Johnson laboratoires). Le placebo utilisé pour le TPO correspondant à une formule à base d'Aa, selon une méthode précédemment publiée (Morisset M, *Clin Exp Allergy*. 2003. Cf. Annexe 3).
Le TPO au lactose en double aveugle versus placebo (glucose), est réalisé à 24 h d'intervalle.

Test de provocation réaliste

Le test réaliste d'inhalation des vapeurs de lait bouilli est réalisé en cabine, en double aveugle avec mise en place d'un pince nez chez le patient et le médecin chargé de la surveillance. Le récipient où est cuit le lait est caché derrière un paravent avec manipulation par une tierce personne. Cette méthode s'inspire de celle publiée par Roberts et al. (Roberts G, *Allergy* 2002). Le médecin charge de la surveillance réalise une spirographie avant et après test de provocation et vérifie la survenue éventuelle de signes cutanéo-muqueux ou respiratoire. Il contrôle la pression

artérielle, fréquence cardiaque, saturation, DEP et CDV toutes les 15 mn pendant 2 heures, la durée d'exposition à la vapeur de lait durant 30 mn. La patiente est surveillée en milieu hospitalier jusqu'au lendemain matin.
Un autre test de provocation réaliste est réalisé en ouvert, avec manipulation en cabine de 30 g de poudre de lactose de qualité pharmaceutique (même lot que précédemment) pendant 30 mn. Les modalités de surveillance sont les mêmes.

Test de provocation bronchique

Un test de provocation bronchique est réalisé avec le même lactose de qualité pharmaceutique en simple aveugle puis en double aveugle versus placebo (NaCl9°/°°), avec un appareillage latex-free. Les modalités de surveillance sont identiques au test réaliste.

Examens biologiques

Electrophorèse du lactose pharmaceutique et de la poudre de Foradil

La poudre de Foradil est diluée dans de l'eau distillée déminéralisée (eau milliQ) puis incubée à température ambiante avec agitation rotative pendant 2 heures. Le mélange subit ensuite une centrifugation à 10.000 g à 4°C pendant 30 mn. Le surnageant est récupéré puis déposé sur une colonne PD 10 afin d'éliminer le lactose. Après passage sur colonne, les fractions récupérées sont lyophilisées.
Le Foradil® et des PLV purifiées (Sigma), caséines, β-lactoglobuline (BLG) et α-lactalbumine, sont analysés en SDS PAGE en condition dénaturantes et réductrices sur gel Invitrogen Nupage 12% bis-Tris gel (Invitrogen, Carslbad USA). Les gels sont colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent (kit SilverSNAP Stain, Pierce, Rockford, Illinois). Les marqueurs See Blue Plus 2 prestained standard et Magic Mark XP (Invitrogen, USA) pour le WB, ont été utilisés comme indicateurs de masse moléculaire (MM).

IgE-Immunoblotting du lactose pharmaceutique et de la poudre de Foradil® :

Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF. La membrane a été saturée dans une solution TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (Tris 0,1M; pH 7,5; 0,15 M NaCl et 0,1% Tween) contenant 1% de gélatine de poisson (Sigma). La membrane est ensuite incubée pendant une nuit avec le sérum de la patiente dilué au 1/10.
Après lavage, la membrane est ensuite incubée une heure, avec une dilution au 1/10000 d'IgG de chèvre, purifiées par affinité, conjuguées à la peroxydase (HRP) et dirigées contre des IgE humaines (Kirkegaard & Perry Laboratories Gaithersburg, USA).
Les protéines reconnues par les IgE des patients sont révélées par chimiluminescence (ECL plus Westernblotting kit. Amersham biosciences).

Dosage semi-quantitatif des protéines de lait dans le Foradil® en technique ELISA:

Pour la détection de PLV, un kit commercial de détection semi-quantitative de protéines totales de lait par méthode sandwich ELISA, a également été utilisé: Neogen Alert® (Neogen Europe, Auchincruive Ayr, Ecosse). Ce test analyse des échantillons préalablement dilués dans un tampon PBS puis déposés dans les puits d'une microplaque préalablement coatés avec des Ac anti-protéines de lait (100µl d'échantillon par puits). Après une incubation de 10 mn, les puits sont lavés puis de nouveau incubés pendant 10 mn avec une solution contenant un Ac PLV marqué (100µl). Après ajout du substrat, la présence de protéines de lait se traduit 10 mn plus tard, par une coloration bleue dont la densité optique (DO) est mesurée après ajout d'une solution bloquant la réaction (Red Stop®). La DO de l'échantillon est comparée à celle de deux contrôles positifs

délivrés par le constructeur, contenant une quantité connue de protéines de lait (respectivement 5 et 10 ppm/100µl).
Dans cette étude, les dosages ont été réalisés en microplaque (Manager Bio-Rad laboratories, Inc.biorad) en duplicata. Un volume de 100µl d'une solution concentrée de Foradil® a été déposé dans chaque puits. Ce volume de 100 µl est l'équivalent de 106 mg de Foradil. La DO des échantillons a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (Benchmark Plus), à une longueur d'onde de 650 nm.

Photographie 1 : Kit de dosage semi-quantitatif des protéines totales de lait par méthode sandwich ELISA Neogen Alert®

I-3-4 Détection de protéines de soja dans une formule infantile à base d'acides aminés

Cf. annexe 9, poster présenté au *congrès de l'American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Miami, mars 2006.* Morisset M, Lee T, Codreanu F, Cordebar V, Fremont S, Guenard L, Kanny G, Moneret-Vautrin DA. Allergy to an amino-acid formula in infants: residual soy allergens in soybean oil are incriminated. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117, Issue 2, Supplement 1*, February 2006, S40.

La prévalence de l'APLV chez l'enfant reste relativement stable depuis ces 20 dernières années (2 à 6 %) (Host A. *Allergy*. 1998). Sa sévérité est variable: divers symptômes gastro-intestinaux, retards de croissance, dermatite atopique (DA), urticaire, angioedème, asthme, anaphylaxie. Son traitement repose sur l'éviction des PLV et leur remplacement par certaines formules infantiles. Les seules formules recommandées par l'European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) et l'European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) sont les hydrolysats poussés de PLV (extensive cow milk protein hydrolysates (CMPH) (Host A, *Arch Dis Child*. 1999). L'utilisation des formules infantiles à base de soja est débattue (SF). En effet, une allergie au soja est observée chez 5 à 14% des patients ayant déjà une APLV (Bock SA, *J. Pediatr*. 1990/ Cantani A, *Euro. Rev. Med. Pharma. Sci*. 1990/ Zeiger RS, *J. Pediatr*. 1999).
L'usage des CMPH n'est pas toujours la panacée puisque des manifestations aigues plus ou moins sévères (choc anaphylactique, rectorragies et urticaire) ou des manifestations plus chroniques (diarrhée, retard de croissance, anorexie) ont été rapportées par divers auteurs avec

ces formules (Klemola T, *J. Pediatr*. 2002/ Hill DJ, *J Allergy Clin Immunol* 1995/ Vanderhoof JA, *J Pediatr* 1997/ Caffarelli C, *Clin. Exp Allergy* 2002). Dans ce type de situation, on recommande de remplacer les CMPH par des substituts à base d'acides aminés (amino-acid-based formula = AAF). Ces formules sont particulièrement recommandées en cas de retard de croissance ou d'allergie alimentaire multiple (AAM), notamment lorsqu'elles surviennent chez des enfants bénéficiant d'un allaitement maternel et pour lesquels les manifestations persistent en dépit d'un régime d'éviction chez la mère (Caffarelli C, *Clin. Exp Allergy* 2002/ Sampson HA, *Pediatrics* 1992/ Niggemann B, *Pediatr Allerg Immunol* 2001). Des publications antérieures ont déjà fait état nombreuses observations où des nourrissons les manifestations allergiques persistantes sous CMPH et lait de soja régressaient sous Neocate®, une AAF (Hill DJ, *J Allergy Clin Immunol* 1995/ Hill DJ, *J Pediatr* 1999/ de Boissieu D, *J Pediatr* 2000). Le Neocate® est considéré comme un produit tout à fait sur. Il est utilisé d'ailleurs comme placebo dans les TPO en double aveugle (DBPCFC) dans le cadre du diagnostic d'APLV, d'allergie au soja ou d'AAM (Niggemann B, *Pediatr Allerg Immunol* 2001, Sicherer SH et al. *J Pediatr*. 2001). Jusqu'à présent seules quatre observations d'allergie à une AAF ont été rapportées dans 3 publications. Dans deux publications (3 observations), l'allergène masqué présent dans les AAF correspondait à des PLV (Caffarelli C, *Clin. Exp Allergy* 2002 / Nilson C, *Allergy* 1999). Dans la 3eme publication à propos d'un cas, l'huile de soja a été incriminée (Moneret-Vautrin DA, et al. *Allergy* 2002) (Cf. annexe 10).
Nous rapportons ici 15 cas d'allergie à une AAF (Neocate®, SHS International Laboratories Ltd. Liverpool, UK) chez des nourrissons atteints d'APLV et d'AAM, adressés dans le service de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de 2001 à 2005, en raison de la persistance des symptômes sous AAF.

Observations cliniques

L'évolution clinique de ces 15 nourrissons adressés en raison de la persistance des symptômes en dépit d'une éviction stricte des protéines de lait de vache et des autres allergènes alimentaires suspectés, de l'apport exclusif de CMPH ou d'un hydrolysat de protéines de soja et de collagène de porc (SPPCH) (Pregomine®, laboratoire Milupa) ou un allaitement maternel strict, la mère suivant un régime d'éviction strict du lait. Ces 15 enfants (11 garçons et 4 filles) étaient âgés de 4 à 14 mois (médiane: 8.2 mois) au moment de leur prise en charge, lorsque le diagnostic d'allergie alimentaire multiple est suspectée. Tous ces enfants présentaient une dermatite atopique. Deux enfants avaient présenté des crises d'urticaire, un autre enfant, un angioedème. Dans 8 cas on notait également des douleurs abdominales, des régurgitations anormalement importantes, des vomissements et /ou une constipation opiniâtre. Un retard de croissance était observé dans 2 cas. Tous les enfants étaient issus d'une famille à risque atopique. Après le diagnostic d'APLV, 8 avaient reçu un CMPH (Pregestimil®, Mead Johnson). Chez 5 enfants un SPPCH (Pregomine® Milupa) avait été prescrit sans plus de succès et pour certains, on notait même une aggravation des lésions d'eczéma. La persistance des manifestations sous ces hydrolysats avec un recul d'un à deux mois, a justifié leur remplacement par une AAF, Neocate®, SHS International Laboratories Ltd. Liverpool, GB. Chez 2 enfants, pour lesquels les mères avaient souhaité au départ poursuivre l'allaitement, la persistance d'une dermatite atopique sévère en dépit d'un renforcement du régime maternel sans lait, sans œuf, sans gluten, sans arachide et fruits à coque a motivé la prescription d'emblée d'une AAF. Chez ces 15 enfants, en dépit de l'arrêt de l'allaitement maternel, de l'arrêt du CMPH ou du SPPCH avec une alimentation exclusive par AAF, les symptômes n'ont pas régressé sous cette nouvelle formule avec un recul d'observation d'au moins un mois (Tableau 1).

Tableau 1: Histoire clinique des 15 nourrissons pour lesquels une APLV et une allergie alimentaire multiple est suspectée et non améliorée par les prises en charges diététiques habituellement recommandées.

Patient (numéros)	**Sexe**	**Age** à l'inclusion (mois)	**Symptômes**	**Premier régime mis en place**	**Deuxième regime**	**3eme regime AAF**
1	M	6	DA, AO	*CMPH*		*Neocate* ®: non amélioré
2	F	6	DA, Co, RGO	*Lait de soja*	*SPCH*	*idem*
3	M	8	DA	***AM* s**ans oeuf & "nuts"	***AM** sans oeuf, LV, gluten* & nuts	*idem*
4	M	5,5	DA	*SPCH*		*idem*
5	M	6	DA, RC	CMPH		*idem*
6	M	6	DA	CMPH	*SPCH*	*idem*
7	F	12	DA, AP	***AM sans oeuf*** & "nuts"	***AM** sans oeuf, LV, gluten* & nuts	*idem*
8	M	11	DA, U, AP	*CMPH*	*autre CMPH*	*idem*
9	M	15	DA, Vo	CMPH	*SPCH*	*idem*
10	M	9	DA, Vo, U	*SPCH*		*idem*
11	F	11	DA, RGO	*CMPH*		*idem*
12	F	6	DA	***AM*** sans oeuf & "nuts"	*CMPH*	*idem*
13	M	14	DA	*CMPH*		*idem*
14	M	8	DA	*SPCH*		*idem*
15	M	7	DA, RC	***AM sans œuf et "***nuts »	*CMPH*	*idem*

AAF: Amino-acid based formula= formule à base d'acides aminé; AO: angioedème; AP: abdominal pain = douleur abdominale; C: constipation; CMPH: cow's milk protein hydrolysates; Co: constipation; DA: dermatite atopique; RC: retard de croissance; RGO: reflux gastro-œsophagien; SPCH: soy protein/pork collagen hydrolysates; U: urticaire; Vo: vomissement .

Méthodologie

Tests cutanés

Des prick-in-prick tests (PT) ont été réalisés avec des aliments natifs selon une méthode précédemment publiée (Dreborg S. *Allergy Proc* 1991) utilisant une formule lactée infantile (lait

O-Lac, laboratoire Mead Jonhson) du blanc d'œuf cru, de la morue crue, de la farine de blé et de soja crue et de l'arachide grillée. Des PT et des atopy patch-tests (APT) ont été également réalisés avec du Neocate® et un extrait commercial de soja (laboratoire Allerbio, Varennes en Argonne, France). La positivité d'un PT est définie par un diamètre de papule supérieur ou égal à 75% du diamètre du témoin positif (sulfate de codéine à 9%). Les APT sont réalisés avec des cupules d'aluminium de 12 mm (Finn-chamber®, Epitest Ltd, Oy, Finlande) selon les recommandations de Niggemann et al. (Niggemann B, *J Allergy Clin Immunol.* 2002). La lecture des APT a été pratiquée à 48h.

IgE spécifiques
Les IgE au LDV et au soja ont été analysées par Cap System™ (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suède).

Tests de provocation oraux:
Des TPO en double aveugle ont été réalisés avec le consentement éclairé des parents avec du Neocate ® versus Neocate advance® chez 5 enfants avec un suivi au départ de 24h en milieu hospitalier après chaque test de provocation. En l'absence de réaction, le test de réintroduction en double aveugle Neocate ® versus Neocate advance® (NA) a été poursuivi à domicile durant 7 jours pour chaque AAF avec une période de wash-out sous NA (il fallait bien nourrir ces enfants…). La quantité de produit ingérée quotidiennement correspondait à la quantité habituellement recommandée chez un enfant de même âge en bonne santé.

Comparaison biologique du Neocate et du Neocate advance®:
L'analyse de la composition du Neocate®(N) révèle que cette formule contient une émulsion lipidique comprenant de l'huile de soja Solagen® qui n'entrerait pas dans la composition du Neocate Advance®. Nous avons spéculé que l'émulsion lipidique du N contenait des protéines de soja en quantité suffisante pour induire la persistance des symptômes chez ces enfants atteints d'allergie alimentaire multiple et notamment une APLV et une allergie au soja (Moneret-Vautrin DA et al. *Allergy* 2002). Afin de valider cette hypothèse, nous avons recherché la présence de protéines de soja dans le N et le NA. Ces deux AAF ont été préparée dans du PBS à pH 7.4 et soumises à une électrophorèse de type Tricine SDS-PAGE utilisant des gels de polyacrylamide à 12% et 4.75% respectivement pour le gel de séparation et le stacking gel. Les protéines du gel sont mises en évidence par une coloration au bleu de Coomassie R-250. Pour les immunoassays, les protéines du SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) en utilisant un système de transfert Bio-Rad Trans-Blot et selon les recommandations du constructeur. Les membranes ont été utilisées pour la mise en évidence éventuelle de la fixation d'IgE sur certaines protéines, après incubation en présence du sérum de 5 enfants présentant des réactions allergiques sous Neocate® et du sérum de 4 enfants ayant une allergie prouvée au soja avec des IgE spécifiques au soja respectivement à 100; 47; 87 et 36 kU/L)> L'incubation a été menée pendant une nuit à 4°C, et ensuite âpres lavage, un second Ac anti-IgE humaines conjugue à une peroxydase (HRP) a été ajouté avec une nouvelle incubation d'une heure à 25°C. La fixation d'IgE sur certaines protéines transférées en méthode ECL Western blotting (WB) a été objectivée par un kit de détection (Amersham, Buckinghamshire, UK) suivant les instructions du laboratoire.

Immunoblot inhibition
Des aliquotes de 100µl de sérum dilues au 1:10 v/v dans un tampon TTBS provenant d'un patient allergique au soja avec un taux d'IgE spécifique à 100 kU/L ainsi que du sérum d'un patient allergique au Neocate, ont été individuellement incubes toute la nuit avec un volume

équivalent d’extrait commercial de soja (Allerbio, Varennes-en-Argonne. France) à la concentration finale de 0.1 et 0.2 mg/ml. Les mélanges ont été centrifugés et ensuite les surnageants provenant du sérum de patient allergique au soja ou au Neocate en présence de l’extrait soja, ont été incubés en présence de l’extrait de N et de NA transférés sur membrane PDVF pour objectiver la réduction de fixation des IgE selon la méthode précédemment utilisée.

II RESULTATS

II-1 DETERMINATION DES SEUILS DE REACTIVITE AUX ALIMENTS

Résultats de l'étude des LOAEL et NOAEL à l'arachide

Sur 115 sujets (75 garçons et 40 filles) adressés pour la première fois pour un bilan d'allergie à l'arachide avec TPO, 99 sujets (65 garçons et 34 filles) ont été retenus dans cette étude sur un an. Lorsque les patients ont été inclus dans l'étude, l'âge respectif était compris entre 3 et 25 ans avec moyenne d'âge de 7,9 (+/- 3,4) ans.
Certains sujets présélectionnés au départ en raison d'une histoire clinique d'AA à l'arachide (Cf. tableau 2) avec prick-test et IgE positifs à l'arachide, n'ont donc pas été retenus rétrospectivement, en raison et d'un TPO négatif (dose cumulée atteinte sans réaction: 10 g d'arachide grillée) ou de la valeur trop faible des IgE spécifiques (≤ 15 kU/l) avec un TPO réalisé avec des doses insuffisantes (DC< 10 g) jusqu'à présent, pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'allergie.
L'âge de survenue des premières manifestations allergiques à l'arachide est compris entre 13 mois et 19 ans, avec un âge moyen au moment du diagnostic de 4,0 (+/- 2,2) ans.

Tableau 2: Manifestations cliniques à l'origine de la suspicion d'AA à l'arachide. Pour de nombreux patients, les symptômes précédemment décrits sont associés.

Manifestations cliniques	**Nombre de patients (n)**
Manifestation respiratoires (toux et/ou crise d'asthme) à l'ingestion d'arachide	40
AO à l'ingestion d'arachide	30 dont 3 AO laryngés
Urticaire aigue à l'ingestion d'arachide	21
Réactions par procuration sans ingestion (U, AO, conjonctivite…) :	22 dont 2 A par procuration
Choc anaphylactique	9
Dermatite atopique avec nette régression à l'éviction de l'arachide	18
Signes digestifs : - nausées isolées (No): - douleurs abdominales : - vomissements (Vo):	3 5 12

Dans l'histoire clinique, l'aliment déclenchant et/ou la quantité peuvent être précisés dans plus de la moitié des cas:
- Réaction inaugurale à l'ingestion de **biscuit soufflé à l'arachide** (**Curly®)** dans 27 cas :
    - un Curly® dans 13 cas,
    - entre 2 et 4 Curly® : 4 cas
    - une dizaine de Curly® : un cas.
    - nombre de Curly® ingérés inconnu : 9 cas.

- Dans 24 cas, une réaction après ingestion de cacahuète grillée est à l'origine du diagnostic d'AA, dont un cas seulement après consommation de beurre de cacahuètes. Pour 9 sujets, la dose déclenchante est comprise entre une et une cacahuète et demie. Pour les autres, la dose ingérée n'est pas connue.
-Dans 32 cas, les manifestations sont apparues après consommation des traces d'arachide, dont une réaction chez un nourrisson après allaitement maternel.
- Dans 15 cas, une réaction par procuration à l'arachide, est le mode de révélation de l'AA.
Pour les autres patients, la quantité et forme sous laquelle l'arachide a été ingérée, sont inconnues.

Résultats des tests cutanés :
Le PT test à l'arachide grillée est compris entre 3,5 et 22,5 mm avec une moyenne à 12,2 mm (écart-moyen 3,3).
La différence entre le diamètre moyen des PT chez les sujets réagissant à une DC ≤ à 44,4 mg (11,4 +/- 2,1 mm) n'est pas statistiquement différente du diamètre moyenne des PT chez les sujets réagissant à une DC plus élevée (12,4 +/- 3,7 mm).
Lorsqu'on accroit le seuil à 215 mg, la différence entre le diamètre moyen des PT des sujets réagissant à une DC ≤ 215 mg (12,5 +/- 2,5 mm) et le diamètre moyen des PT des sujets réagissant à une DC plus élevée (11,7 +/- 3,7 mm), n'est pas statistiquement significative.
Lorsqu'on accroit le seuil à 965 mg qui équivaut à environ une arachide, la différence entre le diamètre moyen des PT des sujets réagissant à une DC ≤ 965 mg soit (12,5 +/- 3,1 mm) et le diamètre moyen des PT des sujets réagissant à une DC plus élevée (11,1 +/- 2,9 mm), n'est pas statistiquement significative.

Résultats du dosage des IgE spécifiques :
Les IgE à l'arachide sont comprises entre 1,91 et une valeur supérieure à 100 kU/l. Le dosage est supérieur à 100 kU/l chez 44 sujets et supérieur ou égal à 57 kU/l, valeur seuil prédictive d'AA à l'arachide rapportée par Rancé (Rancé F, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002) chez 60/99 sujets. Cette valeur est inférieure ou égale à 15 kU/l chez 14 enfants pour lesquels un DBPCFC a secondairement confirmé le diagnostic d'AA à l'arachide.
Le taux moyen des IgE à l'arachide des sujets réagissant à une DC ≤ 44,4 mg (76,8 +/- 29,6 kU/l) n'est pas statistiquement différent du taux moyen des IgE des sujets réagissant à une DC plus élevée (67,5 +/- 34,1 kU/l). Il en est de même lorsqu'on compare le taux moyen des IgE à l'arachide des sujets réagissant à une DC ≤ 215 mg (71 +/- 32,6 kU/l) au taux moyen des IgE des sujets réagissant à une DC plus élevée (62,9 +/- 37,9 kU/l).
En revanche, le taux moyen des IgE à l'arachide des sujets réagissant à une DC ≤ 965 mg (70,3 +/- 33,8 kU/l) est significativement plus élevé que celui des sujets réagissant à une DC supérieure (37,6 +/- 37,4 kU/l) ($p < 0,01$) (test de Student).

Résultats des tests de provocation orale :
Des signes subjectifs et objectifs ont été observés pour des doses cumulées (DC) inférieures ou égales à 44,4 mg soit environ 11 mg de protéines d'arachide (Favier JC, et al. *Répertoire général des aliments.* Ed. 1995) chez respectivement 42/99 et 22/99 sujets (Cf. tableau 20).
Des signes objectifs ont été observés **dès la DC de 4,4 mg chez 6 sujets**. Les caractéristiques de ces patients sont colligées dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractéristiques des 6 patients ayant présenté des réactions objectivées dès la DC de 4,4 mg (1,1 mg de protéines d'arachide).

Signes subjectifs	Signes objectifs	Histoire clinique	Prick-test arachide (mm)	IgE arachide (kU/l)
	Erythème joue dès 1,4 mg, confirmé à 4,4 mg	U et AO par procuration à l'arachide.	10	> 100
Prurit pharyngé dès 0,4 mg	Doul. abdo., prurit et U à 4,4 mg. TPO ultérieur à 65 mg : dl. abdo., Vo	A et AO et après consom. traces arachide	17	> 100
Prurit lingual dès 0,4 mg	AO palpébral et prurit à 4,4 mg. TPO ultérieur à 965 mg : A, rhinorrhée, dl. abdo. et diarrhée.	A après consom. traces arachide	11	> 100
Prurit lingual dès 0,4 mg	Doul. abdo. et diarrhée à 4,4 mg. TPO ultérieur à 130 mg : A, conjonct. et prurit généralisé.	AO après consom. de gâteaux apéritifs à l'arachide	11	> 100
	Prurit vélo-palatin, sibilants, dl. abdo., chute signif. TA à 4,4 mg.	A, AO et Vo. après consom. d'1 cacahuète (M&M's).	11	15,7
	AO labial et dl. abdo. à 4,4 mg	A et AO après consom. traces arachide (matières grasses végétales)	11	76,8

A : asthme ; AO : angioedème ; dl abdo. : douleurs abdominales ; TA : tension artérielle ; Vo : vomissements

Chez les 77/99 qui n'ont pas présenté de réactions objectivées avec une dose cumulée de 44,4 mg, un DBPCFC à l'arachide avec des doses supérieures, a été mené chez 65 sujets.
Bien qu'aucun signe objectif n'ait été observé à la DC de 44,4 mg, le TPO n'a pas été poursuivi au-delà chez 12 sujets. Cinq d'entre eux, ont présenté des signes subjectifs à une DC < 44,4 mg.

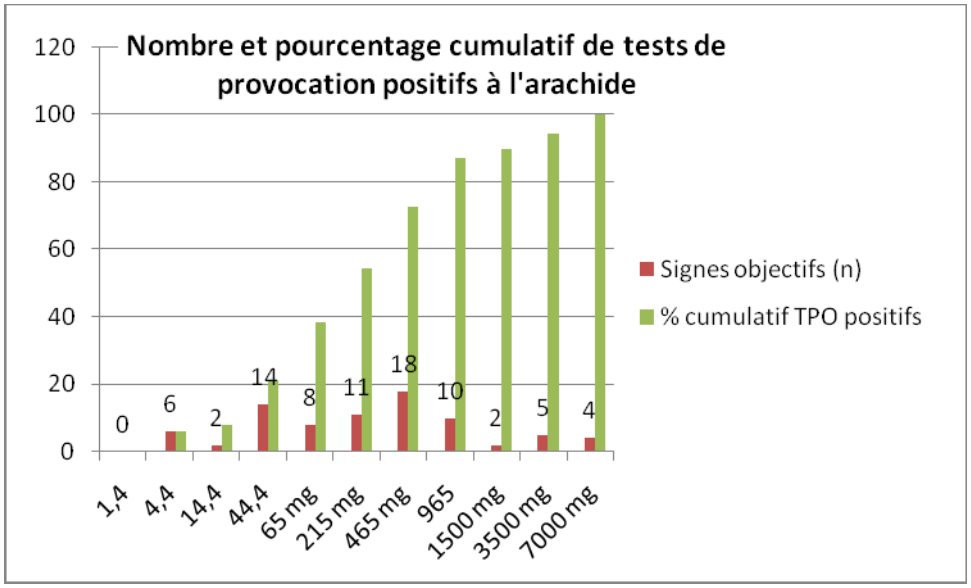
Tableau 4 nombre et pourcentage cumulatif des sujets ayant présenté des réactions objectives et subjectives pour des doses cumulées (DC) ≤ 44,4 mg d'arachide grillée.

Dose cumulée réactive	**100 µg**	**400 µg**	**1,4 mg**	**4,4 mg**	**14,4 mg**	**44,4 mg**	nombre de sujets: **99**
Signes subjectifs (n)	3 (2/3 sujets TPO positif à 44,4 mg)	3 (3/3 sujets TPO positif à 4,4 mg)	1	8	4	23	42
% cumulatif réactions subjectives	3,0	6,0	7,1	15,2	19,2	42,4	-
Signes objectifs (n)	0	0	0	**6**	**2**	**14**	**22**
% cumulatif TPO positifs				**6,1%**	**8,1 %**	**22,2 %**	**-**

Pour les 7 autres, les parents ou patients n'ont pas souhaité jusqu'à ce jour, poursuivre le test à des doses supérieures. Leurs caractéristiques cliniques montrent que l'allergie à l'arachide est probablement une allergie à risque :
- N°1 : AO par procuration à l'arachide. IgE sp. > 100 kU/l, PT arachide: 20 mm.TPL grade III.
- N°2 : U, AO et rhinorrhée après ingestion d'1 curly. IgE sp.> 100 kU/l, PT arachide : 15,5 mm.
- N°3 : CA, A après ingestion de traces dans un gâteau, U par procuration. IgE sp. 62,2 kU/l, PT arachide: 25 mm.
- N°4 : U et AO par procuration avec des traces d'arachide. IgE sp. 76,5 kU/l, PT arachide: 10,5 mm.
- N°5 : AO après ingestion d'1 curly. IgE sp. > 100 kU/l, PT arachide: 15 mm.
- N°6 : U par procuration avec des traces d'arachide. IgE sp. 91,3 kU/l, PT arachide: 14 mm.
- N°7 : A après ingestion de traces d'arachide dans un gâteau apéritif. IgE >100 kU/l, PT arachide: 6,5 mm.

Parmi les 65 patients chez lesquels les TPO ont été poursuivis à des doses supérieures, chez 7 sujets - du fait de la survenue dans le passé, d'un CA ou d'une réaction sévère après exposition à de petites doses et/ou de l'absence d'accord parental pour tester l'arachide à des doses plus importantes-, le TPO n'a pas été poursuivi jusqu'à ce qu'une dose cumulée réactive soit atteinte. Parmi ces sujets, la DC de 500 mg n'a pas été dépassée chez 5 d'entre eux et pour les 2 autres, la DC réactive est au delà de 965 mg.
Au total sur 99 sujets inclus, un seuil de réactivité avec des signes objectifs, a pu être déterminé chez 80 d'entre eux (Cf. Fig. 1).

Figure 1: Représentation du nombre et pourcentage cumulatif des tests de provocation positifs à l'arachide chez les 80 sujets ayant une allergie à l'arachide confirmée par TPO.



II-2 Synthèse d'allergènes recombinants: implications dans le diagnostic in vitro et in vivo de l'allergie à l'arachide.

Résultats :
Cf annexe 5: Astier C, Morisset M, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1): 250-6.

II- 3 Détection de traces d'allergènes dans les aliments

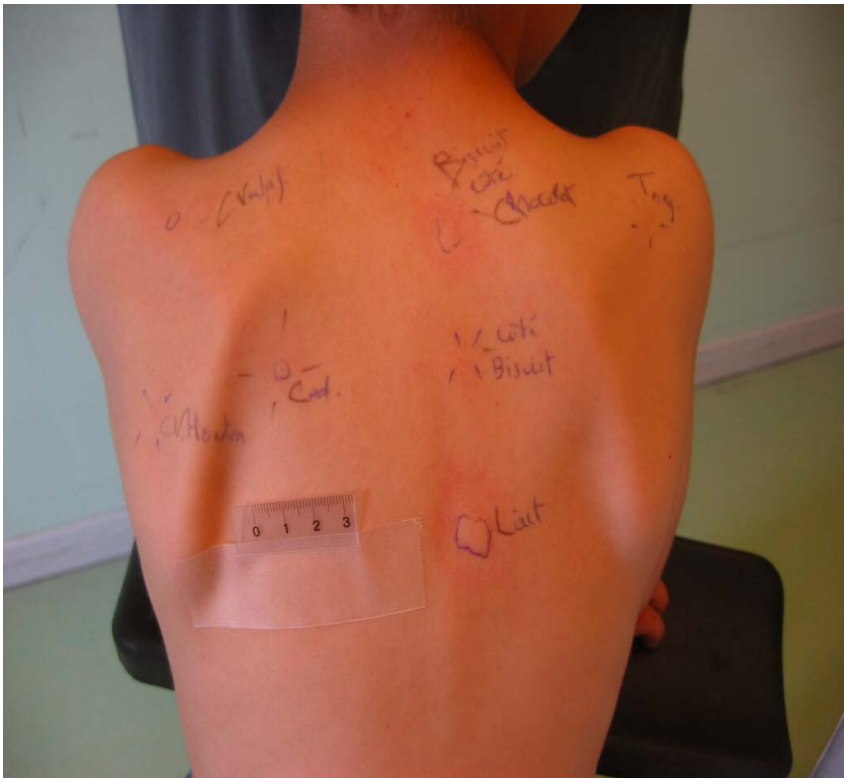
I-3-1 Résultats de la détection de PLV dans un biscuit diététique garanti sans lait

Résultats concernant les 2 enfants ayant présenté des manifestations cliniques à l'ingestion de biscuit chocolaté Valpiform.

Tests cutanés
Les PT témoins au sérum physiologique sont négatifs chez les deux enfants et les PT au sulfate de codéine à 9%, sont respectivement à 4.5 et 4 mm.
Les PT au lait sont positifs chez les 2 enfants respectivement 7 mm chez le premier et 9 mm chez le deuxième. Les PT avec la couche non chocolatée du biscuit sont négatifs. En revanche, le PT avec la couche chocolatée du biscuit est positif chez ces 2 enfants, respectivement 4.5 et 3 mm (Cf. photographie N°2). Le PT avec la couche chocolatée (même lot) est négatif chez 3 témoins sains non atopiques.
Les PT avec 4 autres marques de chocolat (sans lait et autres allergènes classiques): poudre de chocolat Van'Houten, chocolat Dardenne 51% cacao, Montignac 85 % cacao et de chocolat suisse surfin Bonneterre sont tous négatifs chez les deux enfants.

IgE spécifiques
Les IgE au lait de vache sont respectivement à 1.23 kU/l chez le premier enfant et 2,54 kU/l chez le deuxième. Les IgE au cacao sont inférieures à 0.35 kU/l.

Test de provocation orale
Le TPO avec la poudre de chocolat Van Houten a été négatif jusqu'à une DC de 7110 mg.



Photographie N° 2: Patient N°1. Prick-tests au lait de vache, avec le biscuit chocolat (coté biscuit et coté chocolat), à la poudre de chocolat Van Houten ainsi qu'avec le témoin positif (codéine) et le sérum physiologique utilisé pour diluer le biscuit.

Résultats de l'étude prospective de sensibilisation au chocolat Valpiform chez 29 patients présentant une allergie IgE-dépendante au lait de vache

Les 29 patients ont tous un PT positif au lait de vache (moyenne 6,3 mm avec des extrêmes allant de 2 à 11,5 mm). Une sensibilisation au chocolat Valpiform® (même lot D testé chez l'ensemble des patient) est objectivée par des PT positifs chez 8/29 patients soit 26,7 % (si le critère de positivité du PT est un diamètre >50% diamètre du PT à la codéine- souligné en vert) et chez 6/29 sujets soit 20 % (si le critère de positivité pour un PT est un diamètre ≥75% diamètre du PT à la codéine- souligné en vert foncé) avec des PT ayant un diamètre compris entre 0 et 3 mm (Cf. tableau 5). Une comparaison de la taille du PT au chocolat Valpiform à celle du Van Houten a été effectuée chez 9 sujets. Le PT au chocolat Valpiform est positif chez 4/9 sujets tandis que le PT au Van Houten est négatif chez tous sauf un, qui s'avère avoir une vraie allergie au chocolat (réaction clinique au chocolat et IgE cacao positive à 1,41 kU/l).

Tableau 5: Etude de la sensibilisation par prick-tests au chocolat noir Valpiform.

Prick-tests en mm				
Sujets	**Lait O lac**	**Chocolat Valpiform**	**Codeine**	**Chocolat Van Houten**
1	5	0,5	2	
2	3	0	4	
3	4	0	2,5	
4	6	0	3	
5	5	1	3	0
6	2,5	0,5	3	0
7	11	2	2	
8	3	0,5	3	
9	8,5	2	2,5	
10	4	0	3	
11	5	1,5	3,5	
12	8,5	0,5	4	
13	7,5	1,5	3	
14	2	0	4,5	
15	9	1	3	
16	7,5	0	3	
17	2	0	2	
18	3,5	0	2,5	
19	2	0	4	
20	5	3	3	
21	8,5	1	3,5	
22	11,5	0,5	5	
23	7	2	2	0
24	6,5	3	2,5	0
25	7,5	1	3	0
26	3	0,5	2	0
27	9,5	1,5	3	0
28	21	0	4	
29	9	3	5	7,5 (IgE cacao 1,41 kU/l)
30	2	0,5	4,5	0
Moyenne (mm)	**6,3**	**0,9**	**3,2**	

RAST-Inhibition:

Le RAST au lait a été inhibé par le lait en poudre aux concentrations de lait allant de 3,55 µg/L à 3,55 g/L, avec des pourcentages d'inhibition allant respectivement de 19 % à 94 % (fig. 2).

De la même manière, une inhibition du RAST au lait par une solution de chocolat du lot B à concentration croissante avec des pourcentages d'inhibition allant de 6.5 à 76% aux concentrations respectives de 25 à 250 mg/ml (fig. 3).

Figure 2: Pourcentage d'inhibition du RAST au lait de vache avec des concentrations croissantes de lait

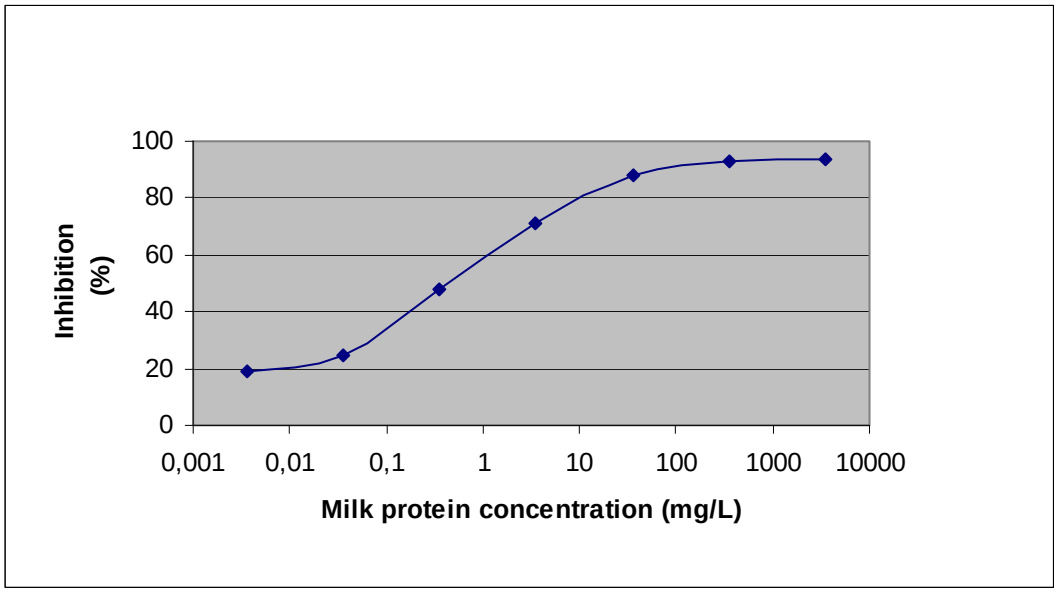
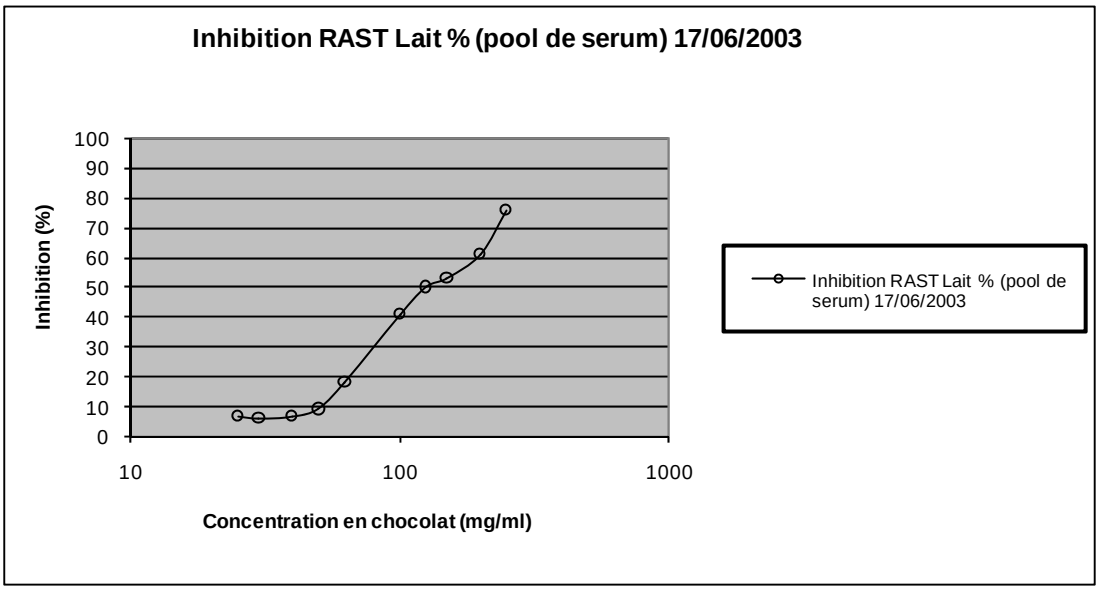


Figure 3: RAST inhibition du lait de vache avec des concentrations croissantes de chocolat noir Valpiform en solution



La quantité de protéines de lait présentée dans le chocolat est donc estimée entre **2 et 3 µg /g de chocolat**. Des contaminations par des traces de lait ont déjà pu être objectivées par cette technique qui permet de détecter des contaminations de l'ordre du ppm (Fremont S, *Allergy* 1996- Koppelman SJ, *J Immunol Methods* 1999).
Le poids du biscuit étant connu ainsi que le pourcentage réservé au nappage chocolat (20%), on peut considérer que le poids du nappage approche 1.65 g. Par conséquent, la quantité de protéines de lait présente de ce lot est comprise entre 3.3 et 4.95 µg /biscuit.
Le premier enfant n'a ingéré qu'une petite partie du biscuit (inférieure à 1/8 du biscuit selon les parents). Par conséquent, si la contamination en protéines de lait dans les lots incriminés ne dépassait pas cette teneur, le premier enfant aurait pu réagir à une quantité de protéine de lait inférieure à 1 µg tandis que deuxième enfant qui a consommé un biscuit entier, pourrait avoir réagit à moins de 5 µg de protéines de lait ce qui serait largement inférieur aux seuils de réactivité préalablement publiés pour l'allergie au lait de vache (Frémont S, et al. Allergy 1996/ Laoprasert N, et al. *J Food Prot* 1998/ Koppelman S, et al. *Lancet* 1999/ Morisset M, et al. *Clin Exp Allergy 2003*). Il ne s'agit en effet que de supputations, le seuil de réactivité des enfants pourrait être beaucoup plus élevé si la contamination des lots de biscuits incriminés qui n'a malheureusement pas pu être évaluée avec cette technique, dépassait largement cette teneur.

SDS PAGE et Immunoblot de l'extrait de la couche chocolatée du biscuit

L'électrophorèse montre la présence de protéines au sein des deux extraits de chocolat Valpiform, (Cf. Figure 4) correspondant aux deux différents lots testés (lots 1102 et 0404). Ces protéines ont toutes des MM compatibles avec des protéines de lait comme en témoigne la comparaison avec la ligne N°1 du lait.

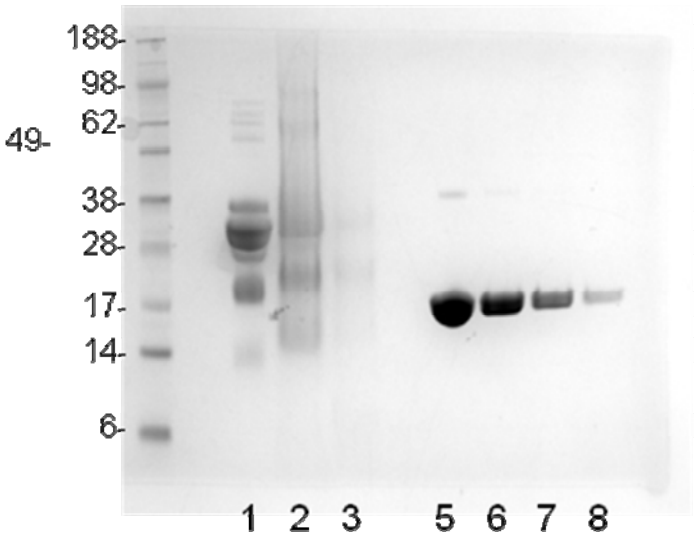


Figure 4: SDS PAGE d'un extrait de lait de vache ½ écrémé, de 2 extraits de la couche chocolatée du biscuit (2 lots différents) ainsi que de βLG purifiée. Coloration au bleu de Coomassie.
Ligne d'extrême gauche : marqueur moléculaire (PM 188-98-62-49-38-28-17-14-6)
Ligne 1: lait de vache ½ écrémé (Regilait) 20 µg de protéines
Ligne 2: extrait de chocolat Valpiform, lot 1102
Ligne 3: lot de chocolat Valpiform, lot 0404
Lignes 5-6-7 et 8: β-lactoglobuline bovine à 1 mg/ml. Dépôt respectif de 20, 10, 5 et 2,5 µg.

Pour le lot 1102, en tenant comparant l'intensité de la bande pouvant correspondre à la βLG, à celle de l'électrophorèse de la βLG purifiée en quantité décroissante, on peut estimer que cet extrait de chocolat contiendrait environ 3 µg de βLG/10 µl. Avec cette méthode, la contamination en BLG de ce lot de chocolat pourrait approcher 0,6 mg/g de chocolat.
Pour le lot 0404, avec le même raisonnement, on peut estimer que cet extrait de chocolat contiendrait environ 1 µg de βLG/15 µl. Avec cette méthode, la contamination en βLG de ce lot de chocolat pourrait approcher 0,1 mg/g de chocolat.

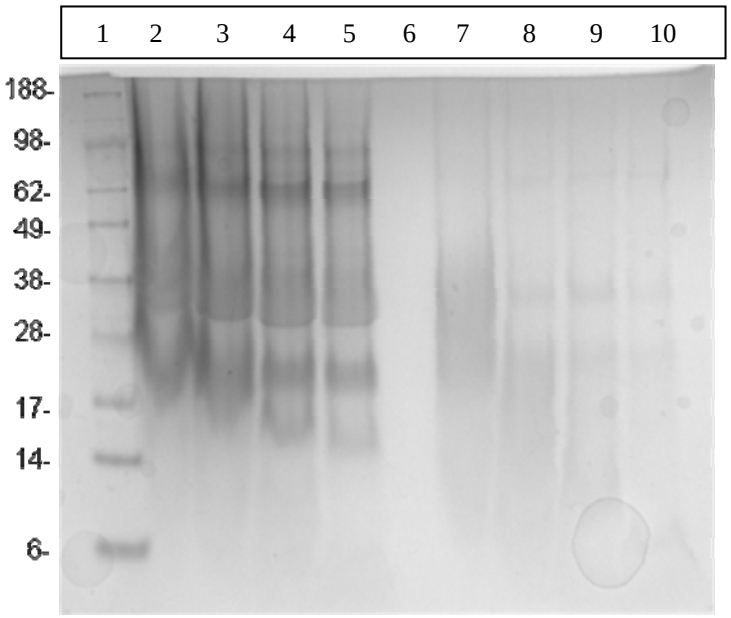


Figure 5 : Coloration au bleu de Coomassie
Ligne 1 : marqueur moléculaire
Ligne 2-5: Valpiform 1102. Ligne 2 : 25 µl ; ligne 3: 20 µl ; ligne 4 : 10 µl et ligne 5 : 5 µl
Ligne 7-10: Valpiform 0404. Idem

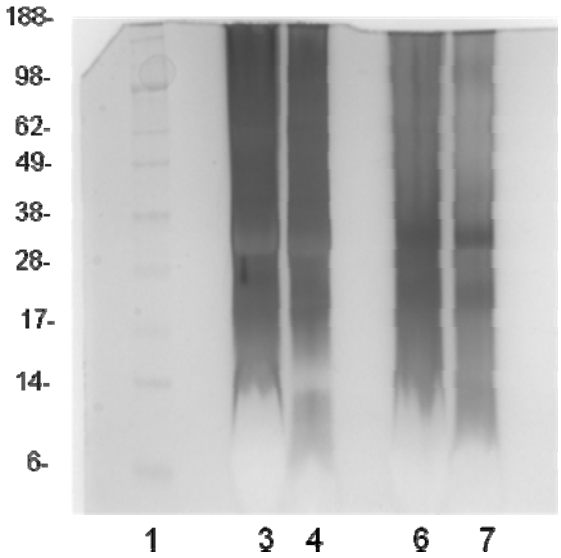


Figure 6: Coloration à l'argent
Ligne 1 : marqueur moléculaire
Ligne 3-4 : Valpiform 1102 10 µl et 5 µl
Ligne 6-7 : Valpiform 0404 10 µl et 5 µl

Le transfert des protéines sur membrane et incubation de cette dernière en présence de sérum de 2 sujets (VIRLU et PICJE) ayant une APLV certaine et un taux élevé d'IgE anti PLV (> 100 kU/l), montre la fixation des IgE à des protéines contenu dans les deux extraits de chocolat (Cf. Fig 7).
Les IgE du sérum de VIRLU se fixent à une protéine de PM proche de 75 kDa, bien visible dans l'extrait du lot 1102 et le lait ½ écrémé, ainsi qu'à deux autres bandes de PM entre 20 et 30 kD pouvant correspondre à des caséines et la βLG (Wal JM. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002).
Les IgE du sérum de PICJE se fixent de façon nette à une protéine de PM proche de 75 kDa, sur une bande de PM compris entre 30 et 40 kDa qui pourraient correspondre à un dimère de βLG et probablement aussi sur une bande aux alentours de 20 kDa.

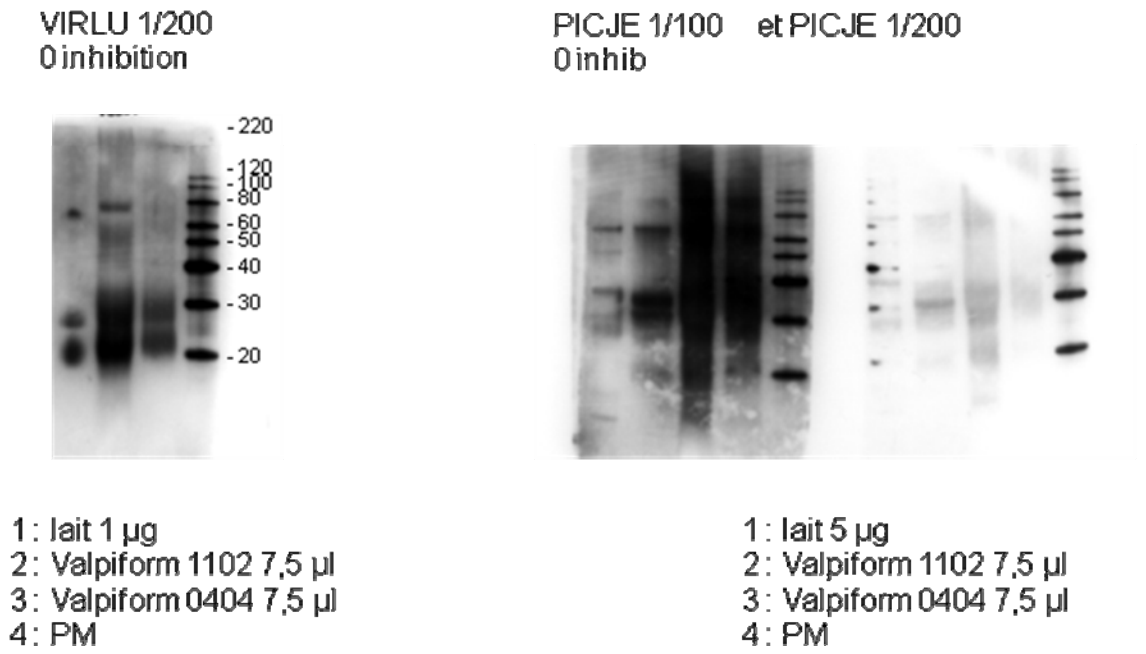


Figure 7: western blot d'extrait de lait de vache ½ écrémé et de deux différents extraits de la couche chocolatée du biscuit Valpiform® (2 lots différents) en présence du sérum de deux patients allergiques aux protéines de lait de vache.

Inhibition d'immunoblot

L'incubation préalable du sérum des patients allergiques aux PLV en présence de lait de vache ½ écrêmé à dose progressivement décroissante 1 mg ; 0,1 et 0,01 mg, montre l'inhibition complète de la fixation des IgE sur la membrane pour les deux sera, y compris pour la plus faible dose, pour les deux sera et les deux lots de biscuits chocolatés (figure 8).
L'inhibition de la fixation des IgE par la BLG à dose progressivement décroissante 2 mg, 1 mg et 0,1 mg, montre une inhibition complète de la fixation des IgE avec 2 mg de βLG vis-à-vis des protéines du lait à la dose de 1 µg et quasi complète pour les deux sera, pour les deux extraits sauf pour une bande protéique d'environ 30 kDa y compris pour la plus faible dose, pour les deux sera et les deux lots de biscuits chocolatés (figure 9).
L'inhibition dose dépendante de l'IgE-immunoblot par les protéines du lait et la βLG confirment que le chocolat est bien contaminé par des protéines de lait.

Figure 8 : inhibition du western blot par le lait de vache ½ écrémé.

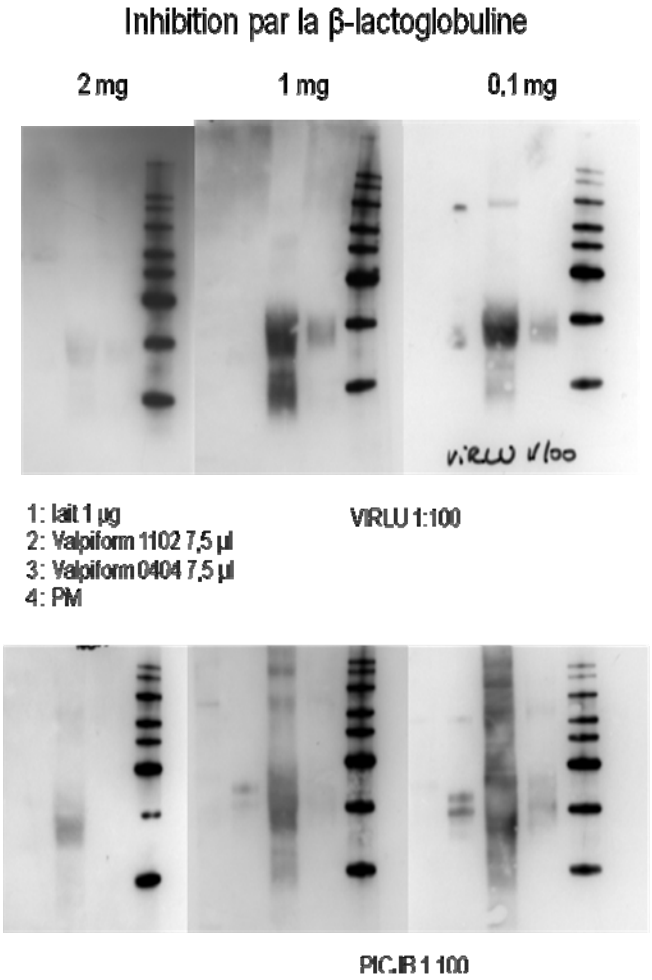


Figure 9 : inhibition du western blot par la βLG bovine.

II- 3-2 Résultats de la détection de traces de protéines de lait de vache dans les probiotiques

Cf annexe 6 et 7
Moneret-Vautrin DA, **Morisset M**, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy* 2006; 61(4): 507-8

Tiger Lee TT, **Morisset M**, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, Codreanu F, Bihain BE, Kanny G. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 119(3):746-7

II- 3-3 Résultats de la détection de protéines de lait de vache dans le lactose

Prick-tests (PT):
- Les diamètres des PT pour le témoin positif (sulfate de codéine 9%) et négatif (NaCl9°/°°) mesurent respectivement 4 mm et 0 mm.
- Les diamètres des PT aux pneumallergènes courants sont respectivement: *D. pteronyssinus*: 3 mm; *Alternaria alternata* : 1 mm; chat: 5.mm; mélange de pollens de graminées: 5 mm; pollens de bouleau: 0 mm; pollens de frêne : 3 mm; latex: 6 mm.
- Les diamètres des prick-in-PT aux aliments naturels mesurent respectivement : blanc d'œuf cru: 15 mm; lait de vache: 5 mm et pour les viandes crues: agneau: 4 mm; bœuf: 5 mm; porc: 7 mm; poulet: 4 mm; dinde: 3 mm; lapin: 3.5 mm.

Les PT à la poudre de Foradil® contenu dans la gélule et au lactose sont négatifs.

IgE spécifiques : la patiente présente un taux d'IgE spécifiques évaluées pour l'œuf à 28 KU/l; pour le lait de vache à 15.4 KU/l; pour l'α-lactalbumine à 0.9 KU/l; pour la β-lactoglobuline à 5.7 KU/l; pour la caséine à 6.7 KU/l et pour la sérum albumine bovine à 16 KU/l.

Tests de provocation:
L'APLV a été confirmée par un test de provocation en double aveugle (DBPCFC) ayant entraîné une exacerbation de la dermatite atopique 24 h après l'ingestion d'une dose cumulée de 63 ml de lait O Lac®.
Le DBPCFC au lactose versus glucose à 24 h d'intervalle, a déclenché 20 mn après l'ingestion de 30 g de lactose, un prurit oro-pharyngé suivi 3 h plus tard, d'une poussée d'eczéma et d'une crise d'asthme nécessitant la prise de salbutamol.
Le test réaliste d'inhalation pendant 30 mn en cabine, de vapeurs de cuisson de lait bouilli en double aveugle s'accompagne au bout de 8 h d'une dyspnée avec toux, sibilants à l'auscultation et chute du DEP de 370 à 270 l/mn.
Le test de provocation réaliste en ouvert, avec manipulation en cabine de 30 g de poudre de lactose, déclenche après 45 minutes rhinorrhée, éternuements et obstruction nasale, sans modification de l'auscultation ou du DEP.
Un premier test de provocation bronchique (TPB) au lactose en simple aveugle, s'avère positif à la concentration 0,5% (soit 0,5 g de lactose pharmaceutique dilué dans 100 ml NaCl 9°/°°). Dix minutes après la fin de l'aérosol (5 ml de la solution soit environ 25 mg de lactose), la patiente a présenté un prurit pharyngé, des éternuements suivis d'une toux avec sibilants à l'auscultation, une chute du DEP de 320 à 240 l/mn et une lipothymie transitoire d'évolution favorable après

aérosol de salbutamol. Une exacerbation de l'eczéma prédominant au visage, est constatée 8 h après la fin du test.
Ce TPB a été réitéré en double aveugle versus placebo (NaCl9°/°°) à 24 h d'intervalle: à la concentration 0,0001% de lactose, on note un prurit vélo-palatin sans modification des paramètres respiratoires. Huit heures plus tard, on observe de nouveau une poussée d'eczéma et l'installation d'une rhinorrhée. La patiente ayant inhalé 5 ml de cette solution, soit 0,005 mg de lactose, le seuil de réactivité aux PLV par voie respiratoire, serait donc inférieur à 0,01 µg de PLV, quantité estimée sur la base du taux de contamination autorisé, soit 0.2%.

Résultats des examens biologiques

L'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) du Foradil (figure 22) met une bande protéique d'environ 28 kDa d'intensité croissant avec la quantité de Foradil déposée au niveau du puits. Pour les dépôts correspondant à 48 mg et 96 mg, une bande diffuse vers 17 kDa, zone de migration des caséines et de la BLG bovine, comme le montre le SDS-PAGE puits 2 et 3, figure 10.

Le gel montre une bande nettement visible dans le puits N°7 qui correspond à un dépôt de 8 mg de Foradil. Compte-tenu de la limite de détection avec une coloration argentique de 10 nano grammes, on peut estimer que le niveau de contamination protéique est au strict minimum de 1,25 ng/mg soit 1,25 ppm.

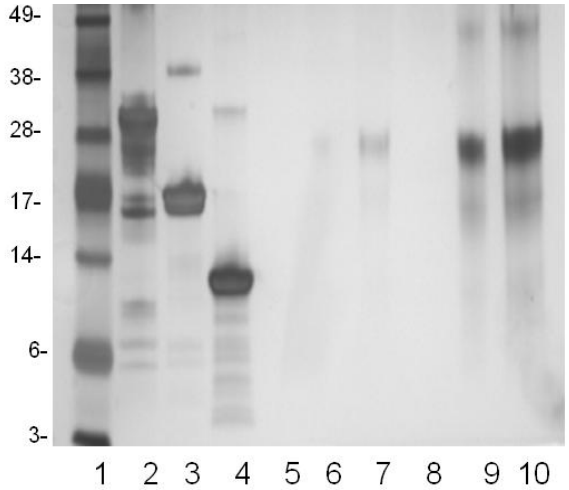


Figure 10 : SDS PAGE du Foradil® coloré à l'argent.
Ligne 1 : PM Ligne 2 : caséine 2 µg Ligne 3 : β-lactoglobuline 2 µg Ligne 4 : α-lactalbumine 2 µg
Ligne 6 et 7 : gélules de Foradil respectivement, 4 mg et 8 mg
Ligne 9 et 10 : solutions de protéines de Foradil (dépôt d'extrait protéique issu de respectivement, 48 mg et 96 mg de Foradil).

Immunoblot du Foradil® en présence du sérum de la patiente.
Si l'immunoblot obtenu avec le sérum de la patiente dilué au 1/10, montre la fixation d'IgE sur différentes bandes protéiques au sein du lait et sur la BLG (fig. 11), en revanche, jusqu'à présent, nous n'avons pas observé de fixation d'IgE sur le Foradil (ligne 4).
Afin de vérifier ces résultats, des sera de patients ayant une APLV certaine mais avec des taux d'IgE au lait plus élevés (>100kU/l) ont été également testés sans plus de résultat.

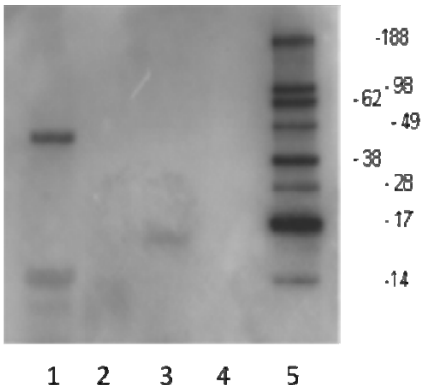


Figure 11 Immunoblot du lait de vache, du lactose et du Foradil après incubation de la membrane en présence du sérum de la patiente dilué au 1/10. Coloration à l'argent
Ligne 1 : lait ½ écrémé Ligne 2 : caséines Ligne 3 : β-lactoglobuline
Ligne 4 : extrait concentré de Foradil® Ligne 5 : marqueur de masse moléculaire

Dosage semi-quantitatif des protéines de lait dans la poudre de Foradil® en technique sandwich ELISA:
La présence de PLV dans l'extrait concentré de poudre de Foradil® est confirmée par le test ELISA qui objective une contamination supérieure à 10 ppm comme le montre le tableau 22. Par conséquent, on peut considérer que l'extrait testé contient plus de $1x10^{-3}$ µg /100 µl soit plus de $1x10^{-3}$ µg /106 mg de poudre de Foradil ou plus de 9,4 $x10^{-6}$ µg/mg de Foradil® soit près de 1x 10^{-3} ppm.

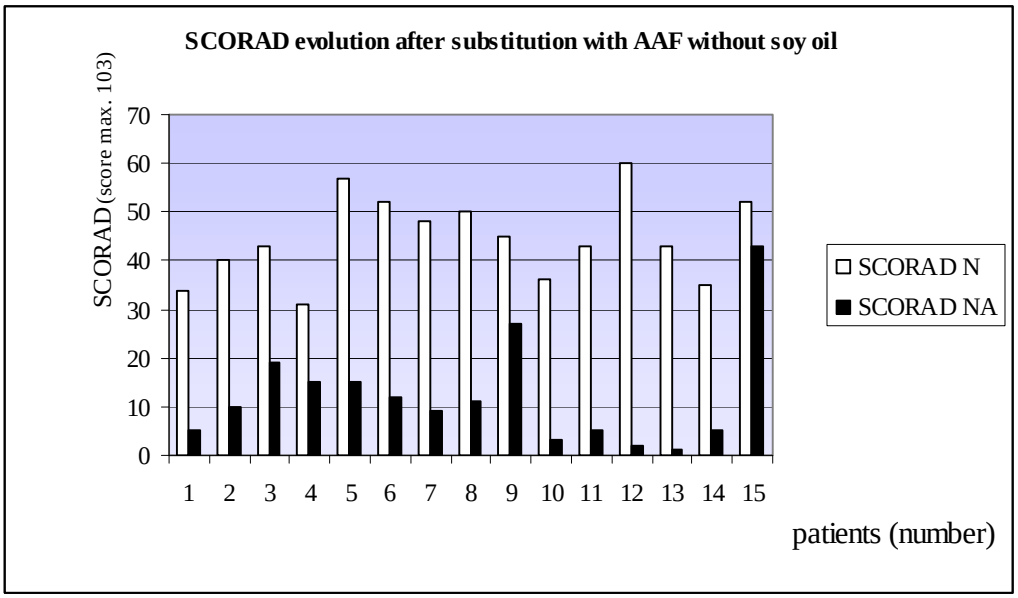
Tableau 6 : résultats du dosage semi-quantitatif des protéines de lait dans le Foradil par ELISA (kit Alert Neogen®)

	0 ppm	5 ppm	10 ppm	Foradil®
DO	0,155	0,571	0,902	1,325

II-3-4 Résultats de la détection de protéines de soja dans une formule infantile à base d'acides aminés

Evolution clinique
La persistance des manifestations allergiques sous alimentation exclusive par Neocate nous a amenés à suspecter une hypersensibilité à un des composants de cette AAF. Cette formule a été remplacée par une autre AAF, Neocate advance (SHS International Laboratories Ltd.), dépourvue d'huile de soja. Apres un régime exclusivement basé sur l'apport de NA, la dermatite atopique s'est nettement améliorée en 2 à 4 semaines, comme en témoigne l'amélioration du SCORAD (**Sco**ring **A**topic **D**ermatitis) (Fig. 12) (European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993). Le SCORAD moyen chez ces 15 enfants, avant et après remplacement du N par du NA est passé de 45 (SD +/-9) à 11 (SD +/-12), ce qui s'avère statistiquement significatif avec un test de Khi2 ($p < 0.001$).

Figure 12: Amélioration du SCORAD chez 15 NRS en 2 à 4 semaines, après remplacement du Neocate® par le Neocate advance®.



TPO prospectif en double aveugle, Neocate® versus Neocate advance®

Après au moins un mois de régime exclusivement basé sur l'apport de NA, un test de provocation orale en double aveugle N versus NA, a été proposé aux parents afin de confirmer l'allergie au Neocate. Cinq familles seulement ont accepté de réaliser ce test. Le DBPC s'est avéré négatif durant les 24 premières heures de surveillance hospitalière chez 5/5 enfants ; en revanche sa poursuite à domicile s'est avérée positive au bout de quelques jours chez tous (Tableau 7). Les symptômes observés correspondaient le plus souvent à une poussée de DA, une anorexie chez 3 d'entre eux, une constipation chez 2 et une toux chez un seul sujet.

Tableau 7: TPO en double aveugle à domicile, chez 5 nourrissons, du Neocate® versus Neocate advance® : symptômes fonctionnels rapportés par les parents et données de l'examen clinique.

Patients	**Randomisation de la 1ere semaine**	***Symptômes sous Neocate®***	**Symptômes sous Neocate advance®**
1	Neocate advance®	*Second jour: urticaire perilabiale, sévère constipation nécessitant un lavement (7eme jour).*	Pas de symptoms
2	Neocate®	*6eme jour: Anorexie, exacerbation de la DA (SCORAD 30/103) et toux*	Pas d'exacerbation de la DA: lésions stables a minima (SCORAD 10 /103)
3	Neocate®	*Anorexie et après 7 jours importante exacerbation de la DA sur tout le corps*	Pas d'exacerbation de la DA: lésions minimes stables sur le cou, le dos et les aisselles.
4	Neocate Advance®	*Constipation notée dès le premier jour et persistant durant les 6 premiers jours. Pas d'aggravation de l'eczéma: (SCORAD 15/103).*	Pas d'exacerbation de la DA: lésions minimes stables (SCORAD 15/103)
5	Neocate®	*3eme jour: DA et constipation. 6eme jour: les parents stoppent le produit en raison d'une exacerbation importante de la DA au visage, mains et fesses*	Pas d'exacerbation de la DA: lésions minimes stables sur les mains et les poignets

Tests cutanés

Les résultats des tests cutanés sont présentés en détail dans le tableau 8. Les PT sont positifs pour le lait de vache, le soja, l'œuf, l'arachide et la farine de blé dans respectivement 7/15, 2/15, 10/15, 7/15 et 6/15 patients.
Les APT sont positifs au LV chez 11/11 sujets testés ; pour le soja, chez 11/14 sujets testés ; pour l'huile de soja chez 5/7 sujets testés et pour le blé, chez 3/9 nourrissons testés. Les APT au N sont positifs à 48 heures chez 7/13 enfants testés (Photographie N° 3).

Photographie N°3: Patch-test positif au Neocate® (++). Lecture à 48 heures (patient 14).

IgE spécifiques
Les IgE au PLV sont positives chez 9/15 enfants et les IgE au soja sont positives chez 6/15 d'entre eux (tableau 24)

Résultats biologiques

La présence de quantité détectable de protéines non hydrolysées dans chaque AAF a été analysée comme cela est montré dans la figure 13. Le SDS PAGE des AAF a été comparé à un extrait commercial de soja. Deux bandes protéiques d'une masse moléculaire apparente de 20 et 40 kDa ont été identifiées -bien qu'elles soient en quantité faible- dans l'AAF contenant des huiles de soja (figure 13B). Ces protéines ne sont pas observées dans le NA.
Afin de déterminer si ces protéines correspondent effectivement à des allergènes, un IgE specific western blotting (WB) a été réalisé avec une incubation en présence du sérum de patients ayant une allergie certaine au soja.

Tableau 8: manifestations cliniques et résultats des tests cutanés au lait de vache, soja et Neocate chez 15 nourrissons ayant des signes cliniques persistant sous Neocate.

N	**Symptoms** sous Neocate®	PT Codeine/ control negatif (mm)	**PT** LV (mm)	**IgE** LV (kU/l)	**APT** LV	**PIP Soja** (mm)	**IgE Soja** (kU/l)	**APT soja**	**APT Neocate**
1	DA, AO	3/0	5	21,8	+	neg	<0,35	++	+
2	DA, Co, RGO	2/0	neg	<0.35	++	neg	<0,35	+++	+
3	DA	3/0	4	1,04	++	neg	1,06	+++ durée > 1 mois	+
4	DA	3/0	neg	<0.35	+	neg	<0.35	+	neg
5	DA, RC	3/0	neg	0,36	+	neg	<0,10	neg	neg
6	DA	4/0	8	65	nd	neg	<0,35	nd (eczema)	nd
7	DA, AP	3/0	6	1,78	++	neg	0,62	neg	nd
8	DA, U, AP	3/0	5	19,1	nd	1,5	0,91	neg	+
9	DA, Vo	2/0	neg	<0,35	++	neg	<0,35	++	+/-
10	DA, Vo, U	4/0	7	>100	nd	2	5,19	++	++
11	DA, RGO	3/0	neg	pos	++	neg	3,43	++	++
12	DA	2,5/0	neg	<0,35	+	neg	<0,35	++	neg
13	DA	3/0	neg	<0,10	++	neg	6,78	++	neg
14	DA	2/0	neg	<0,35	++	neg	<0,35	+++	++
15	DA, RC	3/0	4,5	13,2	nd	neg	<0,35	++	neg

AO: angioedème; AP: abdominal pain = douleur abdominale; APT: atopy patch-test; βLG: beta-lactoglobuline; Co: constipation; DA: dermatite atopique; LV: lait de vache; nd: not done = non réalisé; RC: retard de croissance; RGO: reflux gastro-oesophagien; PT: prick-test; U: urticaire; V: vomissements.

La Fig.13 B, montre que les sera de 4 sujets allergiques au soja contiennent bien des IgE qui se fixent aux bandes protéiques isolées dans l'extrait de Neocate alors que le NA n'induit aucun signal. Les IgE des 4 patients allergiques au soja se fixent effectivement sur des epitopes linéaires au sein de protéines de 20 et 40 kDa présentes dans le Neocate. Les sera des patients présentant des symptômes sous N, ont des IgE qui se fixent sur ces mêmes protéines résiduelles. A ce stade, nous avons montré que le N mais pas le NA, contenait des traces de protéines reconnues par les IgE de patients allergiques au soja mais aussi par les IgE des patients allergiques au Neocate. L'étape suivante a été de montrer que les protéines contaminant le Neocate correspondaient bien à des protéines de soja. Afin de le prouver, nous avons dépleté les

IgE anti-soja des sera de patients allergiques au soja ou au N (patients ayant une AAM) par une incubation préalable avec un extrait commercial de soja, avant de réaliser le WB. La Fig.13B lignes 6a et 6b, montre que cette incubation déplétive avec un extrait de soja supprime la fixation ultérieure des IgE du sujet allergique au Neocate, sur les protéines de Neocate®. Nous avons confirmé que ces protéines correspondaient bien à des protéines de soja en inhibant aussi la fixation des IgE du patient mono-allergique au soja. La Fig.14 montre que les IgE du patient se fixent à l'extrait de soja et de N mais pas au NA. La pré-incubation du sérum en présence d'extrait de soja décroît la fixation des IgE sur l'extrait de soja et de N, de manière dose dépendante. Il est donc raisonnable de conclure que le N contient bien des traces de protéines de soja non hydrolysées capables de se lier aux IgE spécifiques de patients allergiques au soja et aux IgE de patients allergiques au Neocate®.

Figure 13: SDS-PAGE et IgE-Western blot avec un extrait de soja, de Neocate® et de Neocate advance® en présence de sera de patients ayant une allergie au soja ou au Neocate®.
A: première et Sde ligne: SDS-PAGE avec le marqueur de poids moléculaire (M) et l'extrait commercial de soja. Lignes 1a, 2a, 3a et 4a: IgE-WB de l'extrait commercial de soja en présence du sérum de 4 patients ayant une allergie prouvée au soja (*IgE sp. au soja respectivement à 100, 47, 87 et 36 kU/L).
B: première et seconde ligne SDS-PAGE: Neocate® (N) et Neocate advance® (NA).
Lignes 1b, 2b, 3b et 4b: IgE-WB de NA et N en présence du sérum de 4 patients allergiques au soja *.
Lignes 5a et 6a: IgE-WB au NA et N en présence du sérum de 2 patients allergiques au N.
Lignes 5b et 6b: Immunoblot inhibition de la fixation des IgE aux protéines de N, en présence des mêmes sera de patients allergiques au Neocate mais préalablement incubes avec un extrait de soja à la concentration de 0.2 mg/ml.
Lignes 7 et 8: WB de N en présence d'un sérum contrôle de sujet non atopique.

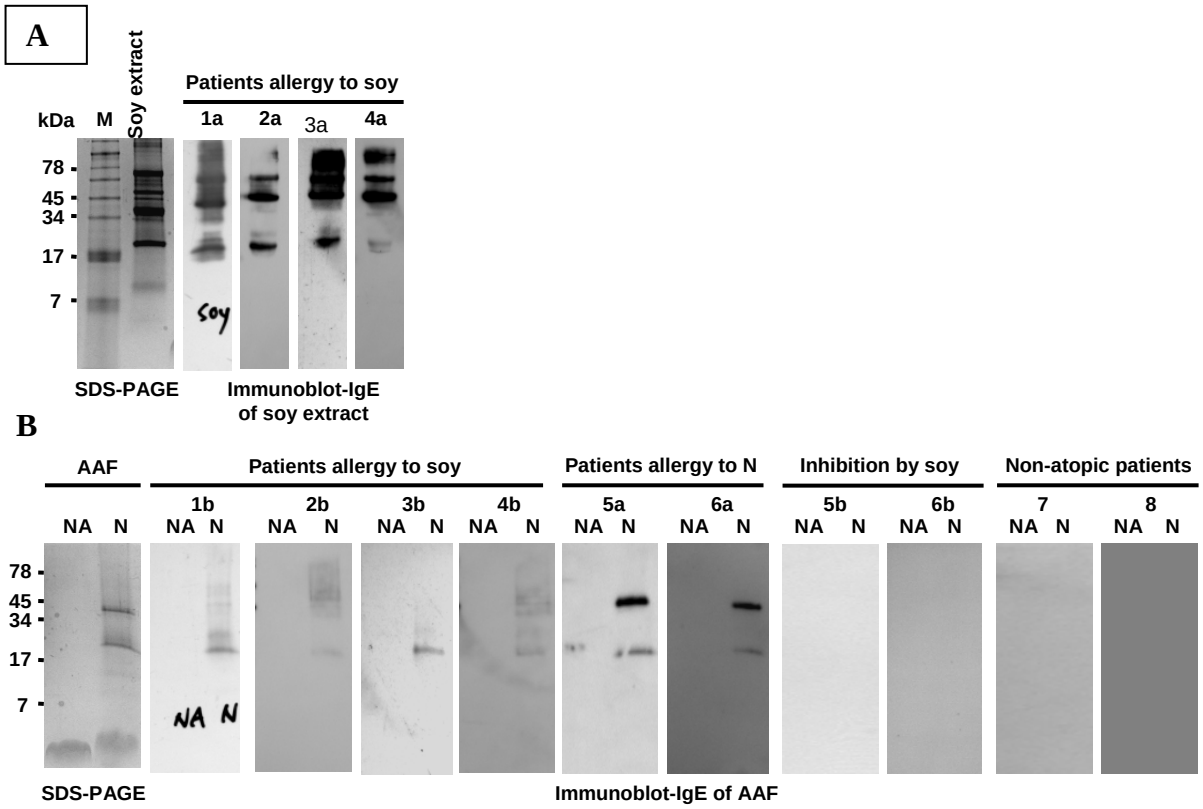
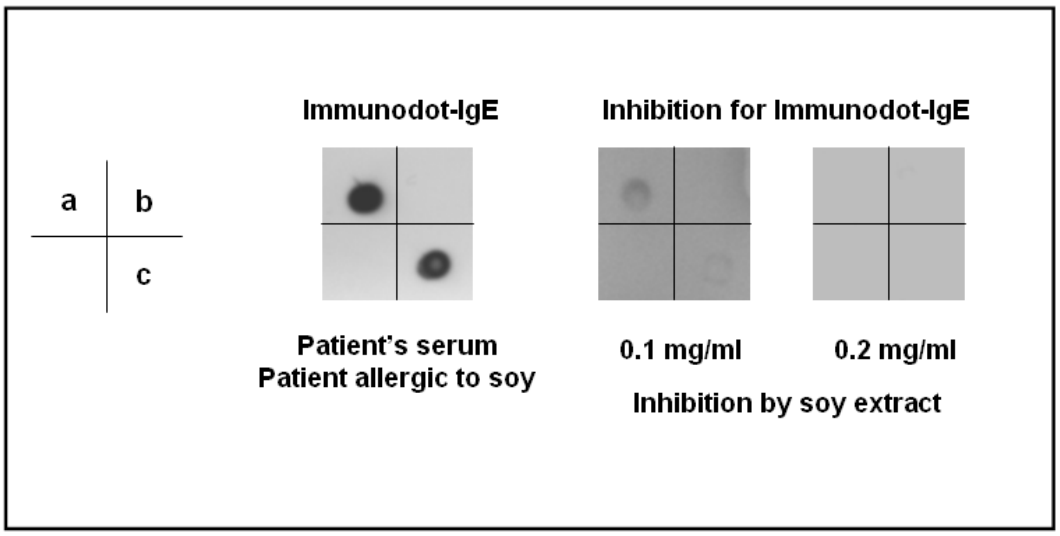


Figure 14: Immunodot-IgE avec un extrait de soja (a), de Neocate advance® (b) et de Neocate (c) en présence du sérum d'un patient allergique au soja (IgE soja = 100 kU/l).
Immunodot-IgE inhibition en présence du même sérum ayant subit une incubation préalable avec un extrait commercial de soja à la concentration de 0.1 et 0.2 mg/ml.



a: soy extract
b: Neocate advance
c: Neocate

III DISCUSSION

III-1 DETERMINATION DES SEUILS DE REACTIVITE AUX ALIMENTS

Discussion concernant les LOAEL et NOAEL de l'allergie à l'arachide

Le développement de stratégies préventives pour lutter contre le développement et les conséquences de l'allergie alimentaire passe par une meilleure maîtrise des données épidémiologiques et l'amélioration des connaissances sur les risques d'exposition aux allergènes. Pour l'AA à l'arachide, si le pourcentage d'individus sensibilisés à l'arachide a pu être évalué en France entre 0,3 et 0,75 %. (Morisset M, *Allerg Immunol*. 2005. Cf. Annexe 11), (Morisset M. et al. *Allerg Immunol*. 2005), en revanche, la prévalence de l'allergie à l'arachide a proprement parlé, n'est pas connue. Aux USA, elle est estimée aux alentours de 1 % (Sicherer SH et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003).

Plusieurs études ont tenté d'établir le seuil de réactivité minimal à l'arachide. C. Bindslev-Jensen et al. ont proposé des seuils de réactivité théoriques. Moins d'un sujet pour un million d'individus allergiques réagirait à 0,7 µg d'arachide (Bindslev-Jensen C, *Allergy* 2002).
Dans l'étude des seuils de réactivité que nous avions publié en 2003 à partir des données de la banque CICBAA, le LOAEL pour l'arachide était estimé à 5 mg d'arachide grillée (soit 1,25 mg de protéines) ce qui signifiait que 0.97% des patients testés réagissait dès la première dose (Morisset M, et al. *Clin Exp Allergy 2003*,Cf annexe 3) et de ce fait, le NOAEL n'avait pu etre évalué.
Les données de la méta-analyse de Taylor et al. (Taylor SL, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002) amènent à considérer que 0,32% des sujets allergiques à l'arachide réagiraient à l'ingestion de 250 µg de protéines d'arachide soit 1 mg d'arachide.
Parmi les seuils les plus bas publiés dans la littérature, on retrouve l'étude de Hourihane menée chez 14 adultes allergiques à l'arachide. Deux d'entre eux ont présenté des signes subjectifs dès la dose de 100 µg (Hourihane JOB, et al. *J Allergy Clin Immunol* 1997). Parmi les 26 patients observés par Wensing et al., un sujet aurait présenté des signes objectifs à 100 µg (Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, Koppelman SJ, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002). Le NOAEL a été estimé à 30 µg dans ce groupe de 26 adultes.
La détermination des seuils de réactivité déterminée par test de provocation orale en double aveugle a déjà fait l'objet d'un consensus (Taylor SL, et al. *Clin Exp Allergy* 2004).
Bien qu'une étude ait déjà été menée en 2006 pour déterminer le NOAEL chez un groupe d'enfants présentant une allergie à l'arachide (Flinterman AE, *J Allergy Clin Immunol* 2006), notre étude est néanmoins intéressante car elle apporte des éléments de réflexion supplémentaires. En effet, elle montre que plus de 6 % des sujets allergiques à l'arachide présentent des manifestations objectives dès 4,4 mg de protéines d'arachide. Trois sujets parmi eux ont présenté des symptômes subjectifs (prurit lingual) qui ont démarré à la DC de 0,4 mg, ce qui correspond donc au LOAEL. Il faut donc conclure que le NOAEL est en dessous de 0,4 mg. Le NOAEL est donc placé en dessous de la valeur du NOAEL publiée par Flinterman et al. en 2006. L'étude de Flinterman qui n'a été effectivement menée que chez 22 enfants allergiques à l'arachide (dont seuls 63% rapportait une réaction antérieure après consommation d'arachide et seuls 85% présentaient des

IgE spécifiques positives à l'arachide ...!), a estimé le NOAEL à 2 mg de d'arachide puisqu'aucun sujets n'avait présenté de réaction subjective ou objective ou subjective à 1 mg et que les premières manifestations n'apparaissaient que pour 10 mg de farine d'arachide (ce qui correspond à 20 mg d'arachide grillée) (Flinterman AE et al. , *J Allergy Clin Immunol* 2006).
Notre étude a de plus montré que plus de la moitié des patients ayant une AA à l'arachide (55,2 %) (Cf. Fig. 1) réagissent à moins d'un quart de cacahuète (DC 215 mg) et que plus de 85 % réagissent à moins d'une cacahuète (on considère que 965 mg d'arachide grillée représente à peu près le poids d'une arachide).
Les patients qui ont été inclus dans cette étude semblent être des patients beaucoup plus allergiques que ceux qui ont été inclus dans l'étude précédente menée dans ce même service et un service de pédiatrie, publiée il y a 10 ans puisque 25% des patients réagissaient à une dose ≤ 100 mg (Moneret-Vautrin DA, et al. *Clin Exp Allergy* 1998) alors que dans cette étude pour ceux pour lesquels nous avons pu pratiquer un test de provocation jusqu'à ce qu'une réaction objective soit observée, 21,2 % réagissent à une dose ≤ 44,4 mg et 38,6% à une dose ≤ 65 mg. De même, chez les sujets dont l'allergie est confirmée par un TPO positif, la dose réactive moyenne estimée à 781,6 mg (écart-type 1522,5) est légèrement inferieure à celle publiée par Rance et al., puisqu'elle avait été évaluée à 850mg (Rance F, et al. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1999).

Par conséquent, seulement 15 % des patients allergiques à l'arachide peuvent consommer sans danger des aliments industriels où la présence éventuelle de traces d'arachide est signalée. La contamination d'un aliment par des traces d'arachide est souvent inférieure à cette quantité, notamment si le risque de contamination est lié à un empoussiérage provenant d'autres lignes de production au sein d'une même fabrique. Dans d'autres situations, le risque de contamination est très discontinu mais peut-être quantitativement plus important dans le lot contaminé. Si on tient compte du fait qu'une cacahuète pourrait se retrouver accidentellement dans un produit (ex. cacahuète coincée dans un tapis roulant), on peut raisonnablement considérer qu'une contamination puisse correspondre à l'équivalent d'une cacahuète. A l'inverse, il est peu vraisemblable qu'une contamination accidentelle discontinue dépasse 1g d'arachide sans que l'arachide ne fasse alors partie de la recette. Le cas échéant, l'arachide serait alors étiquetée comme un ingrédient soumis à un étiquetage obligatoire (Directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil) et le terme arachide est inscrit sans équivoque. La barrière 965 mg, établie à partir d'une longue pratique des tests de provocation orale (Moneret-Vautrin DA, et al. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000) depuis plus de vingt ans de manière expérimentale, tient compte également du fait que les tests de provocation orale sont effectués dans des conditions basales : asthme stabilisé, absence de prise d'alcool ou d'aspirine ou AINS, absence d'effort…. Toutes les situations précédemment citées ont tendance à faire baisser le seuil de réactivité du patient et c'est la raison pour laquelle d'un point de vue pratique, la consommation d'aliments pouvant être potentiellement contaminés par des traces d'arachide, ne devrait en théorie n'être autorisée que chez les sujets allergiques ayant un seuil de réactivité supérieur à 965 mg, tant que des informations plus précises sur la nature de la contamination éventuelle n'est pas plus explicitée par le fabricant. Dans une enquête récente, Hefle et al. ont étudié 200 produits différents commercialisés à Lincoln (Nebraska, USA) où la présence éventuelle de traces d'arachide ou de l'arachide comme ingrédient mineur est signalée. Dans les lots testés, la dose d'arachide mesurée et rapportée à une portion alimentaire est estimée selon les produits, entre 0.1 et 180 mg d'arachide (0.025–45 mg de protéine d'arachide) (Hefle SL, et al. J *Allergy Clin Immunol* 2007).

Faut-il tenir compte des signes subjectifs pour déterminer le NOAEL ? Nous avons observé que des signes subjectifs étaient notés avec une DC≤ 44,4 mg chez 42/99 sujets (Cf. tableau 4). Chez les 3 sujets ayant présenté des signes subjectifs dès la première dose soit 100 µg, l'AA à l'arachide est objectivée chez 2 sujets par des signes objectifs à une DC de 44,4 mg.

Le premier patient a présenté dans le passé un choc anaphylactique (CA) après avoir consommé 3 à 4 curly, les IgE arachide sont > 100 kU/l et le prick-test à l'arachide est à 10 mm. Lors du test, il s'est plaint d'un prurit buccal dès la dose de 100 µg suivi de douleurs abdominales et vomissements avec une DC de 44,4 mg. Le deuxième patient qui aurait présenté auparavant une urticaire, un malaise avec pâleur lors de la consommation de cacahuète (quantité indéterminée) avec IgE arachide à 99,6 kU/l et un prick-test à 12 mm, a présenté un prurit auriculaire et vélo-palatin dès 100 µg suivi de douleurs abdominales, vomissements, AO palpébral et conjonctivite à 44,4 mg.
Pour le troisième sujet qui a présenté un prurit buccal, langue, lèvres, cou ayant tendance à se généraliser dès 100 µg, le TPO n'a pas été mené au delà de 44,4 mg et on peut penser que la DC réactive se situe au-delà (sujet ayant présenté dans le passé une U et un AO après absorption d'1 cacahuète (M&M's): IgE sp. 53,7 et prick-test à l'arachide à 4 mm). Bien qu'aucune réaction n'ait été notée avec le placebo, on peut se demander si ces manifestations subjectives ne correspondraient pas à des manifestations d'anxiété.
Chez les 3 patients qui ont présenté des réactions subjectives à 400 µg (Cf. tableau 3) des signes objectifs ont été observés chez tous les patients à des doses supérieures: chez le premier patient (prurit pharyngé) les signes se complètent par une urticaire et des douleurs abdominales à 4,4 mg. Un TPO ultérieur à la DC de 65 mg entraîne douleurs abdominales et vomissements. Chez le deuxième patient (prurit lingual), le TPO à la DC de 4,4 mg déclenche douleur abdominale et des diarrhées et plus tard, des signes plus sévères : asthme, conjonctivite sont observés à la DC de 130 mg lors d'un nouveau TPO. Pour le troisième patient qui ressent des nausées des 400 µg, des signes objectifs ne sont véritablement objectivés (urticaire et vomissements) que lorsque la DC de 965 mg est atteinte soit pour une dose 2400 plus importante…
Dans la mesure où chez deux sujets qui ont présenté des signes subjectifs dès la dose de 100 µg, les signes ont persisté aux doses suivantes et les signes objectifs ont été observés à des doses supérieures, l'apparition de signes subjectifs des 100µg semble correspondre au véritable seuil de réactivité pour ces deux patients. Si on doit donc tenir compte des signes subjectifs comme cela été proposé par Flinterman et al., le NOAEL à l'arachide serait inférieur à 100 µg.

En conclusion, cette étude semble confirmer qu'afin de pouvoir prévenir des accidents y compris parmi une population de patients extrêmes allergiques à l'arachide, les méthodes de détection de l'arachide dans les aliments industrialisés, doivent atteindre un seuil de détection inferieur à 1 mg par kilogramme d'aliment manufacturé soit < 1 ppm comme cela a été déjà proposé par d'autres auteurs (Poms RE, et al. *Food Addit Contam* 2004). Il est utile de noter que selon les kits disponibles sur le marché, les seuils de détection de l'arachide sont compris entre (0.2-1.2 mg/kg) (Kiening M, et al. *J Agric Food Chem* 2005).
Le seuil de 1 ppm semble acceptable car aucun patient n'a présenté de réactions objectives en dessous de 4,4 mg d'arachide. En réalité, cela veut dire que si 100 sujets allergiques à l'arachide étaient amené à consommer 100 g d'aliment (ex. un gâteau pesant 100 g), cela veut dire que 3% d'entre eux pourraient présenter des réactions subjectives mineures alors que le dépistage de l'arachide dans les gâteaux serait négatif… Même si la quantité d'aliment était doublée, triplée voire quadruplée (ingestion d'une portion de 200 à 400 g), la quantité d'arachide ingérée pourrait entraîner certes, des manifestations subjectives mineures chez 6% des sujets allergiques à l'arachide, mais la quantité d'arachide ingérée ne causerait chez aucun sujet, des manifestations sérieuses.
La détermination des seuils de réactivité est donc une étape importante dans les procédures de prévention de l'anaphylaxie alimentaire. L'arachide en raison de la prévalence des accidents a fait l'objet des premières études. Celles devront être menées pour les autres aliments à haut risque anaphylactogène, notamment pour les fruits à coque – le LOAEL est estimé à 1 mg pour la noisette selon Wensing et al., mais le NOAEL n'a pas été déterminé pour l'instant (Wensing M, et

al. *Clin Exp Allergy*. 2002). La première dose testée devra être inferieure à 100 µg compte tenu du fait que nous avons observé des signes subjectifs à 100 µg. Il semble utile de démarrer les tests de provocation à 10 µg comme cela a été proposé par le groupe d'étude multicentrique coordonné par Taylor (Taylor SL, et al. *Clin Exp Allergy* 2004). Nous avons montré, qu'il est nécessaire de sélectionner des individus à haut risque et d'étudier ce risque sur un échantillon de patients suffisamment important, si possible dans le cadre d'études multicentriques, compte tenu de profils de réactivité variables pour un même allergène, d'un pays à l'autre.

III-2 Discussion sur l'apport des allergènes recombinants au diagnostic in vitro et in vivo de l'allergie à l'arachide.

Cf annexe 5: Astier C, Morisset M, et al. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1): 250-6.

Ce travail a été une première étape confirmant l'intérêt du développement des allergènes recombinants *Ara h* 1, *Ara h* 2 et *Ara h* 3 pour le diagnostic de l'allergie à l'arachide. La pratique originale de prick-tests avec les allergènes recombinants d'aliments, vient confirmer les données biologiques.
Les résultats de cette étude pilote ont été ultérieurement validés par une étude prospective chez 94 sujets allergiques à l'arachide ayant bénéficié d'un DBPCFC contemporain du dosage des IgE spécifique. Ce groupe a été comparé à un groupe témoin non atopique et un groupe de sujets atopiques non allergiques à l'arachide (communication G. Kanny, symposium CICBAA octobre 2007, publication en cours de rédaction). Cette étude confirme l'excellence de la sensibilité et spécificité du dosage des IgE en ImmunoCap® (laboratoire Phadia) vis-à-vis de r*Ara h1*, *Ara h2* et *Ara h3* de l'ordre de 99%. La performance de ce test qui dépasse largement celle du dosage des IgE par la même technique vis-à-vis de l'extrait naturel d'arachide (f13), a motivé la valorisation commerciale de ce test par le laboratoire Phadia (Uppsala, Suède) disponible début 2008.

L'étude de la réponse des IgE ciblée sur un allergène permet de mieux comprendre les phénomènes d'allergie croisée entre différents aliments ou entre aliments et certains allergènes respiratoires. En cas d'antécédent de réaction clinique évocatrice d'une AA, elle permet de conseiller l'éviction préventive de certains aliments pour lesquels l'homologie des protéines serait élevée et de prévenir une éventuelle anaphylaxie sévère, et si possible d'éviter un test de provocation orale qui est à la fois couteux (hospitalisation, absentéisme scolaire au travail) et potentiellement dangereux.

III- 3 Discussion sur la détection de traces d'allergenes dans les aliments

III-3-1 Discussion sur la détection des protéines de lait dans le biscuit diététique.

Plusieurs cas d'anaphylaxie par ingestion accidentelle de protéines de lait ont préalablement été rapportés dans la littérature (Fremont S. *Allergy* 1996 ; Oppenheimer *J Allergy Clin Immunol* 1998; Laoprasert *J Food Prot* 1998 ; Cantani *J Investig Allergol Clin Immunol* 1999/ Gern et al. *N Engl J Med*. 1991). Bock (*JACI* 2001) a rapporté 32 cas d'anaphylaxie létale d'origine alimentaire, dont un cas est attribué à une APLV.
Dans nos observations, une allergie à la fève de cacao a été évoquée au départ mais la réalisation de prick-tests négatifs avec d'autres produits à base de chocolat a permis d'écarter ce diagnostic.

L'allergie aux composants de la fève de cacao est par ailleurs exceptionnelle, bien que souvent incriminée comme responsable de manifestations allergiques. Celles-ci sont souvent liées aux effets irritants des amines biogènes contenues dans le chocolat et sont souvent de faible intensité. Les cas d'allergie immédiate après consommation de chocolat sont effectivement plus souvent liés à la présence d'autres aliments: arachide, noisette, sésame et lait en particulier… Divers tests de détection ont ainsi été développés pour la détection des principaux allergènes alimentaires dans le chocolat (Hurst W et al. *J Immunoassay Immunochem* 2002/ Scheibe et al. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001/ Hefle SL et al. *J Food Prot.* 2004).
Dans le cas de cette observation, la contamination pourrait être considérée au premier abord comme une « faute » professionnelle, puisque le fabricant garantissait l'absence de lait dans le chocolat. Cette contamination à l'origine d'un premier accident en juillet 2002 est établie par l'étude menée sur un lot de fabrication ultérieure (janvier 2003). Néanmoins après avoir discuté avec l'entrepreneur et visité son industrie, nous nous sommes aperçus que des tests de dépistage à la recherche de contamination par des protéines de lait étaient régulièrement pratiqués. Le test était réalisé avec un kit commercial (références non communiquées par l'industriel), assurant un seuil de détection de 5 ppm. Sur l'échantillon testé, le taux de contamination est inférieur à 3 ppm. Il est donc possible que le test de détection utilisé par l'industrie n'ait pas pu détecter ces traces de lait.

La dose susceptible d'avoir entraîné une réaction chez le premier individu ne peut être qu'estimée car le lot de chocolat testé en RAST inhibition, ne correspond pas à celui qui a été ingéré par les enfants au moment de la réaction.
Pour le deuxième enfant, le SDSPAGE montre que le lot responsable d'une réaction clinique contenait bien des protéines dont la teneur pourrait approcher 0,6 mg/g de chocolat soit 600 ppm. L'immmunoblot a montré que ces proteines sont effectivement capables de se lier à des IgE provenant de sujets allergiques au lait. L'inbition du WB confirme la spécificité de liaison des IgE à des proteines de lait. Pour les deux lots testés en SDG et WB, une approximation grossière, laisse supposer que la quantité de lait présente dans les deux lots testés semble dépasser largement le seuil de détection du kit utilisé par l'industriel (5 ppm)…

La quantité de PLV dans le chocolat, estimée par l'inhibition du RAST au lait (fig. 2 et 3) est nettement inférieure à celles qui ont été publiées dans la méta-analyse du groupe international d'étude des seuils de réactivité prouvée par TPO chez des sujets allergiques aux PLV (Taylor SL, *J Allergy Clin Immunol.* 2002) ou les publications d'observations isolées d'anaphylaxie après ingestion d'aliments contaminés par des PLV (Gern JE, et al. *N Engl J Med* 1991/ Jones RT, et al. *Ann Allergy*. 1992/ Fremont S et al. *Allergy* 1996 / Oppenheimer JJ et al. *J Allergy Clin Immunol* 1998/ Laoprasert et al. *J Food Prot* 1998/ Larramendi CH, et al. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006).
Ceci est très important à souligner car le recueil d'informations précises à ce sujet permet de déterminer le niveau d'exigence pour les seuils des tests de détection des traces d'allergènes dans les aliments.
Certes il existe une discordance entre la dose réactive avec le TPO au lait effectué préalablement chez ces deux enfants et la quantité de protéines susceptibles d'avoir déclenché la réaction après consommation du biscuit chocolaté : un petit suisse soit environ 900 mg, versus 1 µg de protéines de lait…. pour le premier enfant et 8 ml de lait soit environ 260 mg de protéines, versus 5 µg de protéines de lait pour le deuxième enfant. Il faut cependant souligner que les TPO au lait ont été réalisés plus d'une année avant cet incident et que le seuil de réactivité au lait peut diminuer considérablement comme cela a été déjà montré dans des publications antérieures (Barbi E et al. *Allergy*. 2004/ Morisset M, et al. *Allerg Immunol*. 2007. Cf. Annexe 12). On peut également supposer que la contamination dans le biscuit qu'a ingéré le premier patient (lot responsable non testé) était plus importante.

Plusieurs auteurs ont publié des accidents plus ou moins sévères après ingestion de traces de lait qui permettent d'établir un seuil de réactivité au lait. Koppelman a rapporté un cas d'anaphylaxie après avoir absorbé moins de 50 mg de caséine dissimulée dans du saumon (Koppelman S, et al. *Lancet* 1999) tandis que Laoprasert rapporte une réaction anaphylactique après ingestion de 180 µg de protéines de lactosérum contenues dans un sorbet (Laoprasert N, et al. *J Food Prot* 1998). Fremont et al rapportent une reprise des manifestations allergiques après introduction céréales infantiles garanties sans lait chez un nourrisson ayant une APLV guérie sous éviction (Frémont S, et al. Allergy 1996). Le seuil de réactivité est estimé à 100 µg de protéines de lait.
En 2003, nous avions tenté d'estimer à partir des données de la banque CICBAA, le LOAEL pour le lait de vache (Morisset M, et al. *Clin Exp Allergy 2003.* Cf. Annexe 3). L'étude réalisée sur 59 sujets allergiques au lait ayant bénéficié de DBPCFC au lait a estimé le LOAEL à 3,2 mg de protéines de lait (soit 0,01 ml de LV). Etant donné que 1,6 % des patients testés réagissaient dès la première dose, de ce fait, le NOAEL n'avait pu être évalué.
Dans la méta-analyse du groupe international d'étude du seuil de réactivité aux aliments (Taylor SL, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2002), le seuil de réactivité le plus bas enregistré pour le lait de vache correspond à 0.02 ml de lait de vache soit 0.6 mg de protéines, d'après l'étude de Hill basée sur des TPO en ouvert chez 100 sujets. Toutes ces études évoquent des seuils de réactivité sensiblement plus élevés que la quantité supposée avoir été ingérée par les deux enfants en mangeant un ou une partie du biscuit chocolaté. Néanmoins, dans son modèle mathématique basé sur les données de la littérature, Bindslev-Jensen approche ce seuil de réactivité pour le lait, estimé à **0,6 µg** de protéines de lait de vache avec une prise de risque pour un sujet sur 1 million, tandis qu'avec une prise de risque pour un pour cent individus, le seuil atteint **0,87 mg** (Bindslev-Jensen C, et al. *Allergy.* 2002).

La pratique de PT chez un groupe de sujets ayant une AA documentée avec PT positifs à un allergène donné, semble être par ailleurs, une technique tout à fait intéressante pour démasquer une contamination avec cet allergène. La sensibilité et spécificité de cette méthode d'exploration in vivo n'a pas été jusqu'à présent comparée avec les tests biologiques de mesure de traces d'allergènes. Pour des raisons éthiques, évidentes, cette méthode ne peut être retenue que pour des études particulières, avec le consentement des patients et de leur famille, notamment pour valider l'innocuité de certains produits alimentaires de consommation courante. Des tests cutanés ont déjà été pratiqués dans d'autres études afin de valider l'absence de réactivité à certains produits chez des individus ayant une allergie alimentaire bien identifiée (ex gélatine de poisson, maltodextrines et sirops de blé ….) au cours des étapes de validation de l'absence d'allergènicité, suivant la législation Européenne sur l'étiquetage des aliments industrialises.

III- 3-2 Discussion sur la détection de traces de protéines de lait de vache dans les probiotiques

Cf : annexe 6 et 7

Moneret-Vautrin DA, **Morisset M**, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy* 2006; 61(4): 507-8

Tiger Lee TT, **Morisset M**, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, Codreanu F, Bihain BE, Kanny G. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 119(3):746-7

III- 3-3 Discussion sur la détection de PLV dans le lactose

La fabrication du lactose se fait par évaporation du lactosérum, après extraction éventuelle de la matière grasse, des protéines et des sels minéraux, puis par cristallisation du lactose, séparation et séchage des cristaux. Il existe deux qualités principales de lactose: le lactose alimentaire à 99 pour cent minimum de lactose et le lactose pharmaceutique (Codex) à 99,8 pour cent minimum de lactose (Collection FAO 1998: Alimentation et nutrition n°28). Le lactose de qualité pharmaceutique proviendrait de lait écrémé auquel on ajoute dans un premier temps de l'acide chlorhydrique dilué afin de précipiter les caséines qui sont ensuite filtrées. Le lactosérum est ensuite amené à un pH de 6,2 puis les protéines résiduelles subissent une coagulation par chauffage à 93,5°C puis sont de nouveau filtrées. Le liquide résultant est ensuite soumis à des procédures de cristallisation (Gennaro AR, Editeur, *Remington's pharmaceutical sciences*. 1980).
L'intolérance au lactose et l'APLV sont deux entités nosologiques distinctes, l'une relevant d'un déficit en lactase constitutionnel ou acquis et l'autre, d'un mécanisme immunologique. Le diagnostic différentiel est parfois difficile quand l'APLV s'exprime uniquement par des manifestations digestives (Bahna SL. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2002).
Les cas d'APLV attribués à une exposition aux PLV sous forme masquée, lors de l'ingestion de lactose sont rares (Jones RT, *Ann Allergy* 1992/ Fremont S, *Allergy* 1996/ Laoprasert N, *J Food Prot* 1998).
Ce risque a été contesté par Fiocchi et al. (Fiocchi A, *Pediatrics* 2003) qui ont réalisé une étude chez 24 enfants ayant une APLV IgE-dépendante, afin de démontrer l'innocuité du lactose en cas d'APLV.

Dans notre étude néanmoins, l'ensemble des tests de provocation et des analyses biologiques confirme d'une part que la patiente présente une allergie respiratoire aux PLV et d'autre part qu'une exposition au lactose pharmaceutique est capable de déclencher des manifestations allergiques.
La survenue de manifestations allergiques après prise de Foradil® est probablement liée à une contamination du lactose par des PLV comme en témoignent la présence de bandes protéiques de MM compatibles avec des protéines de lait de vache en SDS PAGE et la détection de protéines de lait de vache en ELISA.
La démonstration absolue que les symptômes allergiques observés sont dus à la présence de protéines de lait dans le lactose du Foradil®, n'a pu faite à l'heure actuelle du fait de la négativité de l'immunoblot. Ceci pourrait être du à des variations de lots.
Tout porte à croire qu'il existe bien une contamination par des protéines de lait. Devant l'échec de leur mise en évidence par les IgE, afin de ne pas gaspiller inutilement le sérum de la patiente, un échantillon de Foradil® a été envoyé pour analyse en spectrométrie de masse. Les résultats de cette analyse devraient nous apporter la confirmation de cette hypothèse. Si la présence de lait est confirmée, nous reprendront les analyses en WB en améliorant les méthodes de concentration des protéines.

Le risque d'exposition à des traces de protéines de lait contenues dans le lactose peut s'exprimer lors d'une administration par voie orale, par voie intraveineuse (lyophilisat injectable) mais aussi par voie respiratoire. En effet, le lactose est l'excipient habituellement utilisé lorsque les composés actifs (divers broncho-dilatateurs et corticoïdes) sont administrés sous forme de poudre à inhaler.

Nowak-Wegrzyn A. a rapporté le premier cas d'anaphylaxie à l'inhalation de PLV à l'état de traces dans le lactose d'un tel dispositif (Nowak-Wegrzyn A, *J Allergy Clin Immunol* 2004). Dans cette observation princeps, l'inhalation d'Advair® diskus (association fluticasone et salmeterol) avait induit un bronchospasme et une diminution significative de la pression artérielle. La présence de PLV a été objectivée après dissolution du mélange « lactose + principe actif » dans du PBS puis purification et concentration par une technique de précipitation Page-Perfect (Genotechnology, Inc, St Louis, USA). L'auteur précise que si le test d'inhibition d'ELISA a détecté des PLV dans les poudres de lactose pour inhalateurs, en revanche, une mesure précise n'a pas été possible en raison peut-être d'une glycosylation importante des protéines du fait de l'abondance de lactose, pouvant entrainer une modification de la conformation des protéines et donc, une mauvaise reconnaissance par leurs Ac spécifiques. La présence de protéines de masse moléculaire similaire à la β-lactoglobuline a néanmoins été objectivée en coloration argentique. Un immuno-marquage avec des Ac monoclonaux anti- α et β-caséine, anti-β-lactoglobuline ainsi qu'avec les IgE provenant de patients ayant une APLV sévère, ont permis de mettre en évidence la présence de protéines correspondant probablement à des caséines dans l'Advair®, des β-lactoglobulines dans le Foradil® et le Flovent® (propionate de fluticasone), la présence de ces deux protéines étant de plus objectivée dans divers lactoses de qualité pharmaceutique. L'auteur rappelle que la majeure partie du lactose est ingérée, comme en témoigne le goût légèrement sucré ressenti lors de l'inhalation de ces produits.

Nous rapportons le deuxième cas d'allergie apparue après inhalation de PLV contaminant le lactose des inhalateurs à poudre. Le diagnostic d'APLV IgE dépendante a été établi sur la base d'une sensibilisation avec un prick-test positif et la présence d'IgE spécifiques sériques aux PLV d'une part et un TPO au lait de vache positif d'autre part. Le test réaliste d'inhalation de vapeur de lait comme cela est proposé par Roberts ((Roberts G, *Allergy* 2002), prouve que la patiente est devenu extrêmement allergique, y compris à des traces de protéines transportées dans la vapeur de cuisson…

Si on considère que le DBPCFC oral au lactose est positif à la dose de 30 g et que des traces de protéines peuvent être observées jusqu'à une teneur autorisée de 0,2%, la dose cumulée réactive per os de protéines de lait de vache chez cette patiente peut être estimée à **60 mg** soit environ 1,8 ml de lait (la teneur en protéines de lait de vache étant estimée aux alentours de 32 mg/ml) (Favier JC, Répertoire général des aliments. INRA Editions Lavoisier Tec-Doc. Ed. 1995).

Selon les informations fournies par le laboratoire Novartis, une gélule de Foradil® contiendrait 24,99 mg de lactose monohydraté et 12 µg de formoterol. Les tests préalables effectués sur le Foradil auraient montré une pureté du lactose à 99,8%: on peut donc considérer que la patiente réagit par voie respiratoire à moins de 0,05 mg de protéines de lait ce qui représente 0,002 ml de lait. Ce qui laisse supposer que le seuil de réactivité des bronches serait plus faible que le seuil de réactivité par voie digestive, organe reconnu comme dévolu à l'acquisition physiologique de la tolérance aux protéines alimentaires.

En fait, le seuil de réactivité par voie respiratoire de la patiente semble beaucoup plus bas puisqu'avec un TPB au lactose en double aveugle, des réactions sont objectivées après inhalation d'une quantité de PLV qu'on pourrait estimer aux alentours de **0,01 µg**, ce qui rejoint l'ordre d'estimation de contamination fourni par le SDS-PAGE coloré à l'argent.

Le fait que la quantité de protéines de lait présentes dans l'extrait de Foradil® concentré soit insuffisante pour que les IgE de la patiente reconnaissent et se lient aux protéines peut être du au fait qu'entre la période où la patiente avait présenté des réactions à l'inhalation du Foradil® en 2002-2003 et maintenant, les procédés de purification du lactose ont pu s'améliorer, ce d'autant que le premier cas de réaction au lactose contenu dans ces dispositifs a été publié en 2004 (Nowak-Wegrzyn A, *J Allergy Clin Immunol* 2004). En effet, lorsque nous avons utilisé des lots de Foradil® actuellement délivrés sur le marché, nous n'avons jamais pu objectiver des

contaminations aussi importantes que dans le premier lot datant de la période de l'accident que nous n'avions malheureusement qu'en faible quantité. Nous nous sommes demandés si les fabricants de lactose n'aurait pas, depuis la publication de A. Nowak-Wegrzyn, amélioré les procédures de purification du lactose destiné à la délivrance de médicament sous forme inhalée.
Une autre hypothèse déjà formulée par A. Nowak-Wegrzyn (Nowak-Wegrzyn A, *J Allergy Clin Immunol* 2004) serait qu'il existerait une variation importante de la teneur en PLV d'un lot à un autre.

III-3-4 Détection de protéines de soja dans l'huile de soja de la formule infantile à base d'acides aminés

Nous avons montré que ces 15 enfants allergiques aux PLV et ayant des symptômes persistant sous CMPH et/ou SPPCH puis Neocate® (N), sont remarquablement améliorés par une alimentation exclusive sous Neocate advance® (NA). Nous avons démontré que l'échec de l'alimentation exclusive par N chez ces enfants ayant une APLV et suspects d'AAM était lié à la présence de protéines de soja dans cette formule et leur absence dans le NA.
Il est nécessaire de préciser que le NA est une formule -AAF- réservée à l'enfant âgé de plus de 12 mois. Nous avons donc utilisé cette AAF en la diluant afin de respecter une osmolarité adaptée à des enfants d'âge inférieur.
L'affirmation que ces enfants ont présenté une allergie au Neocate® est basée sur les éléments cliniques et biologiques suivants:

- Le SCORAD décroit après le replacement du N par le NA chez les 15 patients et une amélioration statistiquement significative est observée.
- Les DBFC N versus NA n'ont pas induit de symptômes particuliers après 24 h de surveillance, en revanche des manifestations allergiques sont apparues au delà de ce délai lors de la réintroduction du Neocate chez tous les sujets ayant subi ce test.
- L'analyse des protéines a révélé la présence de protéines non hydrolysées dans le N alors qu'on ne retrouve aucune protéine dans le NA. Le fait que ces protéines résiduelles correspondent bien à des protéines de soja est établi par la réalisation d'IgE-WB qui montre des fixations identiques avec le sérum de sujets ayant une allergie confirmée au soja ou avec le sérum des patients présentant des manifestations allergiques persistantes sous Neocate.
- la preuve que le N est bien contaminé par des protéines de soja est établie avec la disparition de la fixation des IgE sur le WB avec incubation préalable de ces mêmes sera en présence d'extrait de soja.

Ces NRS inclus dans l'étude sont des enfants ayant une sensibilisation alimentaire multiple comme cela est objectivé par divers PT, APT ou dosage d'IgE spécifiques aux aliments. Les manifestations cliniques sont essentiellement une DA sévère, d'installation précoce souvent associée à des manifestations digestives et parfois un retard de croissance. Les allergènes auxquels ces nourrissons sont sensibilisés sont en premier lieu le LV puis l'œuf, le soja, le blé puis l'arachide. Ces patients ont été adressés en raison de leur échappement aux procédures thérapeutiques habituelles en l'occurrence une alimentation exclusive par CMPH ou SPPCH. Dans 4 cas, les manifestations sont apparues sous allaitement maternel et ont persisté en dépit d'un régime maternel drastique excluant le LV, les œufs, le gluten, l'arachide et les fruits à coque. Il a été montré qu'environ 10% des APLV persistaient sous CMPH (Hill DJ et al. *J Allergy Clin Immunol* 1995/ Vanderhoof JA et al. *J Pediatr* 1997/ American Academy of Pediatrics, Committee of nutrition. *Pediatrics* 2000). Pour ces enfants, les AAF apportent une véritable alternative thérapeutique, mais néanmoins, comme nous l'avons montré dans cette étude, pour certains patients particulièrement allergiques, l'apport d'AAF peut être mis en

défaut s'il persiste à l'état de traces, des protéines non hydrolysées. Ces protéines peuvent provenir des émulsions lipidiques associées au mélange d'acides aminés (Aa) ou bien du mélange d'Aa lui-même, les Aa constitutifs n'étant pas tous des Aa de synthèse.
Le diagnostic d'allergie au soja présent à l'état de traces dans le N a été difficile à prouver. Aucun test diagnostic pris isolement n'a permis d'objectiver la sensibilisation au soja. Les IgE spécifiques au soja ne sont élevées que chez 6 sur 15 enfants testés et le PT à la farine de soja n'est positif que 2 d'entre eux. Les APT sont positifs chez 11 sur 14 enfants (un enfant n'a pas été testé en raison de la sévérité de l'eczéma au départ). Même en combinant ces 3 tests, une sensibilisation au soja n'est observée que chez 86.7 % des enfants. Les APT qui traduisent des phénomènes d'hypersensibilité retardée, sont les plus sensibles.
Il est important de noter que les DBFC sur 24h n'ont pas permis d'objectiver de réaction à la réintroduction du N tandis que les symptômes sous N étaient nets au 7eme jour chez tous les patients testés. Cette observation est en accord avec les observations de Hill et al. qui signalent qu'un TPO mené uniquement sur une seule journée est insuffisant pour établir avec certitude l'absence de réaction à un aliment préalablement suspecté (risque de faux-négatif) (Hill DJ et al. *J Allergy Clin Immunol* 1995). La prédominance d'un mécanisme immun retardé par rapport à un mécanisme IgE-dépendant est aussi confortée par la différence entre le pourcentage d'APT positifs au soja (78.6 %) et le pourcentage de PT positifs au soja (13.3 %). Si l'hypersensibilité retardée domine, il n'est donc pas étonnant qu'aucune manifestation ne soit observée le premier jour du test de réintroduction. Peu de parents ont accepté de réaliser un TPO en double aveugle avec réintroduction du Neocate. Le refus et l'anxiété des parents à l'idée de réintroduire une formule susceptible de réenclencher des manifestations allergiques chez un nourrisson est tout à fait compréhensible, ce d'autant que l'amélioration de l'état de sante de leur enfant sous NA a été précédée d'une errance diagnostique pendant plusieurs mois sous différentes formules et par conséquent d'un émoussement de la confiance des parents dans le corps médical.
La principale différence entre le N et le NA repose sur la nature des émulsions lipidiques. L'émulsion lipidique du N contient de l'huile de soja tandis que l'émulsion du NA ne contient que de l'huile de coco, de canola et de carthame. Nous avons détecté la présence de protéines de soja dans la première formule, absentes dans la seconde. Compte tenu du fait que les Aa des deux AAF sont identiques selon les informations fournies par le fabricant (SHS), il est logique de déduire que les traces de protéines de soja proviennent de l'émulsion lipidique à base d'huile de soja. La présence d'allergènes résiduels dans les huiles de soja est un sujet complexe et controversé. Des études avec DBPCFC à l'huile de soja ont déjà été menées chez des adultes allergiques au soja sans montrer de réaction significative. Néanmoins, il faut préciser que ces tests ont été réalisés chez des adultes et non pas des NRS et que d'autre part, les TPO ont été menés sur une période courte contrairement à notre étude (Bush RK et al. *J Allergy Clin Immunol*. 1985). Dans notre étude nous avons montré que des traces de protéines de soja dans les AAF ne sont pas dénuées d'effet secondaires et cela laisse supposer que la biodisponibilité de ces protéines chez l'enfant est peut-être différente de celle de l'adulte ou bien que des effets n'apparaissent que de manière retardées. Chez la souris, il a été montré que la biodisponibilité des allergènes de soja est en effet supérieure chez le souriceau que chez la souris adulte (Weangsripanaval T et al. *J Nutr*. 2005). Les NRS sont probablement un cas particulier et la présence de traces de protéines de soja dans les huiles ou les lécithines de soja pourrait entrainer des manifestations cliniques (Palm M, et al. *Allergy* 1999; Renaud C, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996). Nous devons souligner le fait que le groupe d'enfants suivis dans cette étude ne représente qu'une partie infime des enfants souffrant d'allergie alimentaire mais néanmoins ces sujets bien que peu nombreux sont particulièrement difficiles à prendre en charge. Jusqu'à ces derniers mois, notre stratégie thérapeutique chez des enfants ne répondant pas aux mesures habituelles d'alimentation exclusive par CMPH et/ou SPPCH puis de N était de rechercher systématiquement une allergie aux protéines de soja en plus d'une sensibilisation aux

PLV par les moyens précédemment cités et de proposer d'alimenter l'enfant par du NA, dépourvu d'huile de soja. Nos premières communications à ce sujet et la transmission de ces informations auprès du fabricant de cette AAF ont modifié leurs procédures de fabrication du Neocate® qui désormais, sur le marché français, ne contient plus d'huile de soja. Il est à noter cependant que les formules commercialisées dans d'autres pays européens tels que la Belgique ou le Luxembourg ou bien aux USA, pour l'enfant de moins de 1 an, contiennent encore des émulsions lipidiques à base d'huile de soja…

La présence d'allergènes de soja a déjà été objectivée par différents auteurs dans les lécithines et les huiles de soja avec des teneurs variables selon qu'il s'agit d'huile vierge ou d'huile de soja plus raffinées (Errahali Y, et al. *Allergy* 2002, Cf. Annexe 32 bis; Porras O, *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; Awazuhara H, et al. *Clin Exp Allergy* 1998; Paschke A, et al. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001). Bien que certains auteurs aient montré que l'immunogénicité des protéines de soja extraites dans les lécithines et les huiles de soja non raffinées n'est pas altérée par les procédures de chauffage, l'allergénicité des huiles de soja reste contestée (Bush RK et al. *J Allergy Clin Immunol*. 1985; Palm M, et al. *Allergy* 1999; Renaud C, et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; Errahali Y, et al. *Allergy* 2002; Porras O, *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985 ; Awazuhara H, et al. *Clin Exp Allergy* 1998; Paschke A, et al. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001). Dans un travail antérieur, Errahali et al. ont isolé des traces de protéines de soja dans l'huile pressée à froid (1.8 mg/l), et dans l'huile désodorisée (0.32 mg/l) (Errahali Y, et al. *Allergy* 2002). L'implication de l'huile de soja a déjà été mise en évidence par un test de provocation en double aveugle avec l'émulsion lipidique présente dans le Neocate, le Solagen® (Moneret-Vautrin et al. *Allergy* 2002). Le Neocate® contient 23 g de Solagen® pour 100 g de produit fini (données fournies par SHS International). L'huile de soja est un composant mineur de l'émulsion lipidique mais néanmoins une recherche préliminaire de traces de protéines de soja dans le Solagen® a montré que la teneur en protéines résiduelles était de l'ordre de celle qu'on retrouvait dans l'huile désodorisée (data not shown). Nous avons documenté la présence d'allergènes de soja dans le N et nous avons donc par conséquent spéculé que les protéines de soja résiduelles non hydrolysées provenaient de l'émulsion lipidique entrant dans la composition du Neocate.

Il est de plus intéressant de constater que la pratique de TPO en double aveugle apporte de nouvelles données permettant d'estimer la dose minimale induisant des réactions allergiques assimilée au lowest observed adverse effect level (LOAEL). En toxicologie, la durée de l'exposition à un polluant est importante à prendre en cause pour l'estimation des effets toxiques à long terme. Il semble en être de même pour l'allergie. Cette étude a montré qu'un TPO mené sur une courte période pouvait omettre certains diagnostics d'AA mais aussi sous-évaluer des seuils de réactivité. Cette étude apporte donc de nouvelles données pour l'allergie au soja.

En se basant sur

- les données fournies par le laboratoire SHS International : présence de 23 g de Solagen® soit 3,35 g d'huile de soja pour 100 g de produit fini ce qui correspond après reconstitution à 502,5 mg d'huile de soja pour 100 ml de Neocate
- sur la concentration en protéines dans l'huile de soja raffinée selon Errahali et al. (Errahali Y, et al. *Allergy* 2002) soit environ 0.32 mg/l
- la densité de l'huile de soja : 0,92
- sur une consommation quotidienne d'environ 1000 ml d'AAF/jour chez un NRS,

le seuil de réactivité chez ces 15 enfants –- pourrait correspondre à environ 2 µg de protéines de soja/jour. Ce seuil extrêmement bas pourrait être expliqué par une biodisponibilité particulière des allergènes de soja en phase lipidique comme cela a déjà été observé par Weangsripanaval et al. dans son modèle murin d'absorption gastro-intestinale de l'allergène majeur du soja (Weangsripanaval T et al. *J Nutr*. 2005).

Le risque allergénique des protéines à l'état de traces dans les émulsions lipidiques des formules infantiles a déjà été objectivé pour l'huile d'arachide (Moneret-Vautrin DA, et al. *Lancet* 1991) et l'huile de coco (Couturier P, et al. *Allerg Immunol* 1994). Ces 15 observations cliniques doivent nous amener à s'interroger plus souvent sur la nature des émulsions lipidiques devant la persistance de symptômes chez un nourrisson malgré la mise en place d'hydrolysats de protéine : l'entretien des symptômes est-il lié à la présence de protéines de lait insuffisamment hydrolysées ou l'émulsion lipidique est elle en cause ? En effet, l'huile de soja est présente dans de nombreuses formules infantiles… Cette étude incite au développement de tests simples, fiables et robustes pour la détection des allergènes alimentaires en milieu lipidique et en particulier les protéines de soja et ceci reste encore un important challenge immuno-biochimique.

CONCLUSIONS

Cette thèse a fait le tour d'horizon des connaissances à propos de l'allergénicité des protéines alimentaires et des moyens diagnostiques de l'allergie alimentaire. La dernière partie a regroupé différentes études cliniques ou clinico-biologiques menées en collaboration avec les cliniciens et les biologistes chercheurs de l'équipe de recherche EA3999 *Maladies allergiques: Diagnostic et thérapeutique*, ou les membres du laboratoire de recherche en allergie alimentaire du Mount Sinaï Medical Center à New York. Ces travaux contribuent à l'amélioration du diagnostic et la prévention de cette affection.

Cette étude de l'allergenicité des aliments qui débute par des études cliniques de determination des seuils de réactivité aux aliments a permis d'offrir des données préalables indispensables mais qui manquent cruellement sur le plan international (Cf. communication orale personnelle, 1er orateur, au 5th Workshop on Food Allergen Methodologies, Halifax, Canada, 11 mai 2008) pour fixer ensuite, les seuils de détection des traces des allergenes contaminants dans l'alimentation.

Les différentes études portant sur la detection de traces d'allergenes ont toutes porté sur des produits therapeutiques : biscuit dietetique garanti sans lait, probiotiques, lactose, formule infantile à base d'acides aminés. Ces etudes ont des implications considerables car ces produits sont justement destinés pour des sujets à risque allergique majeur.

L'étude sur le biscuit chocolaté confirme la contamination du chocolat garanti sans lait et destiné à une population ciblée de consommateurs ayant une allergie alimentaire, par des protéines de lait. Nous avons montré que plusieurs lots étaient contaminés et que le niveau de contamination était susceptible de reproduire des accidents anaphylactiques chez de nombreux enfants atteints d'APLV. Cette contamination et le risque engendré, ont été déclarés à l'AFSSA et à la DGCCRF et au Réseau National Français de surveillance des Anaphylaxies.
L'industriel a par ailleurs été rapidement informé de nos résultats et depuis, la mention « garanti sans lait » a été supprimée.
Afin de garantir la sécurité des patients ayant une allergie alimentaire, les industriels qui ont choisi de cibler une population de consommateurs ayant une allergie alimentaire connue, en proposant des produits garantis sans traces d'allergènes doivent appliquer de manière drastique les procédures HACCP afin de maitriser le risque de contamination alimentaire d'une part et d'autre part, doivent s'assurer que les kits de détection utilisés permettent de détecter les allergènes en cause avec des seuils de détection inferieur à 1 µg/g d'aliment et que ce seuil de détection soit applicable à la matrice utilisée en l'occurrence ici, le chocolat.

L'étude sur la contamination des dispostifs en poudre pour le traitement de l'asthme est la deuxième observation vient confirmer la nécessité de recommandations à la prescription de tels dispositifs chez des sujets asthmatiques, ayant une APLV avec un seuil de réactivité faible. Le Foradil® a été définitivement interrompu chez notre patiente et depuis l'administration de β2-mimétiques à longue durée d'action sous forme de spray (sans lactose), est parfaitement tolérée.
Cette montre que le seuil de réactivité aux protéines de lait par voie respiratoire semble plus bas que le seuil de réactivité par voie digestive. La question du risque de rupture de tolérance par inhalation de traces de protéines de lait dans du lactose en cas d'APLV guérie, est posée. D'autres

supports neutres doivent être développés pour la délivrance du principe actif par voie respiratoire, pour lesquels le risque toxique et allergénique est réduit, comme le tagatose par exemple (Taylor SL et al. *Allergy* 2005).

Les APLV évoluant dans le cadre d'AAM sont de plus en plus fréquentes et le développement des AAFs représente un progrès diététique et thérapeutiques incontestable. Néanmoins, le risque d'allergie à des traces de protéines contenues dans les huiles, de soja en l'occurrence, a été démontré chez des nourrissons sensibilisés à cet allergène. Les industries agro-alimentaires et les laboratoires pharmaceutiques doivent tenir compte de ce risque afin de développer des formules plus sures, dépourvues de traces d'allergènes car les formules infantiles à base d'acides aminés sont destinées à l'alimentation de nouveau-nés et nourrissons ayant des terrains aux risques atopiques des plus élevés.

L'allergie alimentaire est une des pathologies émergentes du XXIème siècle et l'augmentation de sa prévalence est observée dans tous les pays du monde, qu'il s'agisse de pays économiquement sous-développés (Cataldo F, et al. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006/ Zar HJ, et al. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007), où l'alimentation reste traditionnelle ou qu'il s'agisse de pays riches (Woods RK, et al. *Eur J Clin Nutr*. 2001/ Sicherer SH, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2003/ Santadusit S, et al. *J Med Assoc Thai* 2005/ Chiang WC, et al. *Clin Exp Allergy*. 2007/ Mullins RJ. *Med J Aust.* 2007/ Gupta R**,** et al. *Thorax* 2007) et les aliments naturels semblent concernés tout autant que les produits alimentaires industriels.
Les études épidémiologiques actuelles montrent que l'augmentation de prévalence de l'asthme semble diminuer notamment en Europe, probablement grâce au diagnostic et à la thérapie qui s'en suivent (Pearce N, et al. *Thorax* 2007/ Mullins RJ. *Med J Aust.* 2007). Tel n'est pas le cas pour l'allergie alimentaire dont le diagnostic et le traitement restent encore difficiles. On observe toujours en effet, exception faite de la Suède, une augmentation préoccupante des réactions anaphylactiques d'origine alimentaire, potentiellement létales (Moneret-Vautrin DA, et al. *Allergy*. 2005/ Foucard T, et al. *Lakartidningen.* 2005/ Gupta R**,** et al. *Thorax* 2007).

Des progrès importants sont encore à mener pour le diagnostic des allergies alimentaires non IgE médiées avec notamment la standardisation des atopy patch tests aux aliments pour l'exploration de la dermatite atopique (Roehr CC, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2001/ Mehl A, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2006) ou certaines AA à expression digestive (Canani RB, et al. *Allergy* 2007/ Fogg MI, et al. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006/ Spergel JM, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2007). On peut espérer que la poursuite des études sur le lien entre certaines affections chroniques du tube digestif et une hypersensibilité aux protéines alimentaires aboutisse sur le développement d'outils diagnostiques peu invasifs, notamment chez le petit enfant. Si les prick-tests sont couramment utilisés comme moyens diagnostic de l'AA IgE-dépendante en Europe, le diagnostic dans tous les pays du monde, sera à l'avenir étroitement tributaire de la biologie, c'est pourquoi cette thèse a développé les connaissances actuelles sur les allergènes alimentaires et les moyens de dosage des IgE spécifiques cliniquement relevantes qui en dérivent.
Neanmoins, l'utilisation d'allergènes recombinants, de bio puces ou de tests d'activation cellulaire, restent tributaires de laboratoire de recherche ou bien représentent un cout qui les mettra hors de portée de l'ensemble des pays en voie de développement.
C'est dire qu'une part essentielle de la prévention de la maîtrise des AA passera par les industries agro-alimentaires. Les procédures de fabrication, la détection de l'allergénicité des aliments sont au cœur du problème de production de produits alimentaires manufacturés restreignant au maximum le risque allergique.

Au delà des travaux qui sous-tendent ces possibilités de détection, les organismes réglementaires ont un rôle essentiel à jouer concernant l'étiquetage des principaux allergènes (Taylor SL, et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2006).
Ainsi, la surveillance constante des risques allergiques alimentaires par le développement de réseaux d'allergovigilance s'appuyant sur l'observation d'allergologues de « terrain » (Pumphrey RS, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2007/ Bock SA, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2007/ Vierk KA, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2007/ Añíbarro B, et al. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007, Flabbee J, et al. *Allergy* 2008), est un élément essentiel documentant les prises de décisions de ces organismes. Il est tout aussi indispensable que ces cliniciens puissent trouver auprès de chercheurs spécialisés dans la Science des aliments, les biotechnologies et l'exploration du système immunitaire, des réponses à leurs interrogations. Seule une collaboration étroite entre ces différents acteurs permettra de faire émerger les outils thérapeutiques (Cf annexe 1 et annexe 12), sans pour autant négliger le fait qu'une véritable maitrise de l'allergie alimentaire passera par une meilleure compréhension des facteurs environnementaux qui concourent à l'expression de cette affection.

REFERENCES

Aabin B, Poulsen LK, Ebbehøj K, Nørgaard A, Frøkiaer H, Bindslev-Jensen C, Barkholt V. Identification of IgE-binding egg white proteins: comparison of results obtained by different methods. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; 109(1): 50-7

Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106(2): 228-38

Aas K. Fish allergy and the cod fish allergen model. In Brostoff J et Challacombe SJ. *Food allergy and intolerance*, Baillière Tindall, London Ed.1987; pp. 356-66

Adachi M, Takenaka Y, Gidamis AB, Mikami B, Utsumi S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J Mol Biol* 2001; 305: 291-305.

Ah-Leung S, Bernard H, Bidat E, Paty E, Rancé F, Scheinmann P, Wal JM. Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk. *Allergy.* 2006; 61(11): 1358-65

Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, Jyo T, Murooka Y, Oka S, Ono K Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, Dermatophagoides farinae. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 74-83

Alcocer MJ, Murtagh GJ, Wilson PB, Progias P, Lin J, Archer DB. The major human structural IgE epitope of the Brazil nut allergen *Ber e* 1: a chimaeric and protein microarray approach. *J Mol Biol.* 2004; 343(3): 759-69

ALINORM 03/34: FAO/WHO Food Standard Programme. 30 Juin-5 Juillet 2003. *C. A. C.*: Appendice III: Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants; et Appendix IV: Annex on the assessment of possible allergenicity. *Rome, Italy: Codex Alimentarius Commission*, 2003, 47-60

Alonzi C; Shreffler W; Pollastrini E; Pecora V; Li J; Bardina L; Nucera E; Schiavino D; Patriarca G; Sampson H. Evaluation of peptide microarray immunoassay of IgE and IgG4 epitopes during specific desensitisation to milk. Göteborg, EAACI meeting 2007. Poster N°137.

Altenbach SB, Pearson KW, Sun SS. Nucleotide Sequences of cDNAs Encoding Two Members of the Brazil Nut Methionine-Rich 2S Albumin Gene Family. *Plant Physiol.* 1992; 98(4): 1520-1522.

Alvarez-Alvarez J, Guillamón E, Crespo JF, Cuadrado C, Burbano C, Rodríguez J, Fernández C, Muzquiz M. Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(4):1294-8.

American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics* 2000;106:346-9

Andersson K, Ballmer-Weber BK, Cistero-Bahima A, Ostling J, Lauer I, Vieths S, Lidholm J. Enhancement of hazelnut extract for IgE testing by recombinant allergen spiking. *Allergy* 2007; 62(8): 897-904

Angelis MD, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, Simone CD, Silano M, Vincenzi MD, Losito I, Gobbetti M VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue probiotics and gluten intolerance. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1762(1): 80-93

Antico A, Soana R. Chronic allergic-like dermatopathies in nickel-sensitive patients. Results of dietary restrictions and challenge with nickel salts. *Allergy Asthma Proc.* 1999; 20(4): 235-42.

Armentia A, Rodriguez R, Callejo A, Martin-Esteban M, Martin-Santos JM, Salcedo G, Pascual C, Sanchez-Monge R, Pardo M. Allergy after ingestion or inhalation of cereals involves similar allergens in different ages. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(8): 1216-22

Armentia A, Callejo A, Diaz-Perales A, Martin-Gil FJ, Salcedo G. Enhancement of tomato allergenicity after treatment with plant hormones. *Allergol Immunopathol* 2003; 31(1): 44-6.

Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, del Pozo V, Pastor C, Gonzalez-Cabrero J, Cárdaba B, Rojo M, Mínguez A, Cortegano I, Gallardo S, Aceituno E, Palomino P, Vivanco F, Lahoz C. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from Anisakis simplex: Ani s 1. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 107(2): 263-8

Arslan G, Gilja OH, Lind R, Florvaag E, Berstad A. Response to intestinal provocation monitored by transabdominal ultrasound in patients with food hypersensitivity. *Scand J Gastroenterol.* 2005; 40(4): 386-94

Asero R, Mistrello G, Falagiani P. Oral allergy syndrome from pork. *Allergy* 1997; 52**:** 686-7

Asero R. Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999; 83(5): 377-83

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Casarini M, Falagiani P. Allergy to nonspecific lipid transfer proteins in Rosaceae: a comparative study of different in vivo diagnostic methods. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001; 87(1): 68-71

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, Verbeek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC. Lipid transfer protein: apan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000, 122: 20-32.

Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Relationship between peach lipid transfer protein specific IgE levels and hypersensitivity to non-Rosaceae vegetable foods in patients allergic to lipid transfer protein. *Ann Allergy Asthma Immun*ol. 2004; 92(2): 268-72

Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, Ogier V, Petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks AW, Bihain B, Sampson HA, Kanny G. Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1): 250-6.

Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez A, Palacios R, Martinez J. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Per a 7*), a cross-reactive allergen. *J Immunol* 1999; 162: 4342-8

Asturias JA, Eraso E, Moneo I, Martinez A. Is tropomyosin an allergen in Anisakis? *Allergy* 2000; 55(9): 898-9

Asturias JA, Eraso E, Arilla MC, Gómez-Bayón N, Inácio F, Martínez A. Cloning, Isolation, and IgE-Binding Properties of *Helix aspersa* (Brown Garden Snail) Tropomyosin *International Archives of Allergy and Immunology* 2002; 128: 90-6

Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL: Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996, 14: 1269-73

Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung D, Lipozencic J, Luger TA, Muraro A, Novak N, Platts-Mills TAE, Rosenwasser L, Scheynius A, F. Estelle R. Simons FER, Spergel J, Turjanmaa K, Wahn U, Weidinger S, Werfel T, Zuberbier T, and for the European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Group. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children

and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1):152-69

Attaran RR, Probst F. Histamine fish poisoning: a common but frequently misdiagnosed condition. *Emerg Med J*. 2002; 19(5): 474-5

Ayuso R, Lehrer SB, López M, Reese G, Ibáñez MD, Martín-Esteban M, et al. Identification of bovine IgG as a major cross-reactive vertebrate meat allergen. *Allergy* 2000; 55: 348–354.

Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 27-37

Awazuhara H, Kawai H, Baba M, Matsui T, Komiyama A. Antigenicity of the protein in the soy lecithin and soy oil in soybean allergy. *Clin Exp Allergy* 1998; 12: 1559-64

Baena-Cagnani CE, Teijeiro A. Role of food allergy in asthma in childhood. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(2): 145-9.

Bahna SL. Cow's milk allergy versus milk intolerance. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2002, 86 (suppl.1): 56-60

Ballmer-Weber BK, Wüthrich B, Wangorsch A, Fötisch K, Altmann F, Vieths S Carrot allergy: double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108(2): 301-7

Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kündig T, Fötisch K, van Ree R, Vieths S.Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(7): 970-8

Ballmer-Weber BK, Lidholm J, Vieths S. Recombinant allergens in the diagnosis of food allergy: Which are the advantages? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2007; 47: 126-8

Bals R, Welsch U. Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of human respiratory epithelium. *Microsc Res Tech* 1997; 38: 505-11.

Bando N, Tsuji H, Yamanashi R, Nio N, Ogawa T. Identification of the glycosolation site of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 347-8

Bannon GA, Ling M, Cockrell G *et al*. Cloning, expression and characterization of two major allergens, Jug n 1 and Jug n 2, from the black walnut, *Juglans niger* (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107**:** S140

Banzet ML, Adessi B, Vuitton DA. Manifestations allergiques après ingestion d'escargots chez 12 malades allergiques aux acariens: une nouvelle allergie croisée? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 1992; 32: 198-202

Barbi E, Gerarduzzi T, Longo G, Ventura A. Fatal allergy as a possible consequence of long-term elimination diet.*Allergy*. 2004; 59(6): 668-9

Barre A, Sordet C, Culerrier R, Rancé F, Didier A, Rougé P. Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. *Mol Immunol*. 2008; 45(5): 1231-40.

Barre A, Jacquet G, Sordet C, Culerrier R, Rougé P. Homology modelling and conformational analysis of IgE-binding epitopes of Ara h 3 and other legumin allergens with a cupin fold from tree nuts. *Mol Immunol*. 2007; 44(12): 3243-55.

Barre A, Borges JP, Rougé P. Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie.* 2005; 87(6): 499-506.

Barre A, Borges JP, Culerrier R, Rougé P. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunol Lett*. 2005; 100(2):153-8.

Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 2004; 172(11): 6978-87

Battais F, Pineau F, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, Moneret-Vautrin DA, Denery-Papini S. Food allergy to wheat: identification of immunogloglin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(7): 962-70

Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodinier M, Denery-Papini S. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005; 60(6): 815-21

Battais F, Richard C, Szustakowski G, Denery-Papini S, Moneret-Vautrin DA, Leduc V, Guerin L.Wheat flour allergy: an entire diagnostic tool for complex allergy. *Allerg Immunol* 2006; 38(2): 59-61

Bauer L, Kohlich A, Hirschwehr R, Siemann U, Ebner H, Scheiner O, Kraft D, Ebner C. Food allergy to honey: pollen or bee products? Characterization of allergenic proteins in honey by means of immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; b97(1 Pt 1): 65-73

Baumgartner S, Steiner I,Kloiber S,Hirmann D, Krska R,Yeung J. Towards the development of a dipstick immunoassay for the detection of trace amounts of egg proteins in food. *European Food Research and Technology* 2002; 214, 168-70

Beardslee TA, Zeece MG, Sarath G, Markwell JP. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen *Ara h 3*. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 299-307.

Beaudouin E, Renaudin JM, Morisset M, Codreanu F, Kanny G, Moneret-Vautrin DA. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis--update and current data. *Allerg Immunol*. 2006; 38(2): 45-51
Beaudouin E, Kanny G, Lambert H, Fremont S, Moneret-Vautrin DA. Food anaphylaxis following ingestion of carmine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74**:** 427-30.
Beezhold DH, Reschke JE, Allen JH, Kostyal DA, Sussman GL. Latex protein: a 'hidden' food allergen? *Allergy Asthma Proc* 2000; 21:301-6

Belchi-Hernandez J, Mora-Gonzalez A, Iniesta-Perez J. Baker's asthma caused by *Saccharomyces cerevisiae* in dry powder form. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97(1 Pt 1): 131-4

Bengtsson U, Nilsson-Balknas U, Hanson LA, Ahlstedt S. Double blind, placebo controlled food reactions do not correlate to IgE allergy in the diagnosis of staple food related gastrointestinal symptoms.*Gut* 1996; 39(1): 130-5.

Ben Rejeb S, Abbott M, Davies D, Cleroux C, Delahaut P. Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Addit Contam.* 2005; 22(8): 709-15

Benveniste J, Egido J, Guttierez-Millet V. Camussi G. Détection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation. *J Allergy Clin Immunol*. 1977, 59 *(4):* 271-9

Berg D. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? *Trends Microbiol* 1998; 6(3): 89-92

Bernard H, Creminon C, Yvon M, Wal JM. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998; 115: 235-44

Bernard H, Negroni L, Chatel JM, Clement G, Adel-Patient K, Peltre G, Creminon C, Wal JM. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human β-casein and bovine β-casein, a major allergen of milk. *Mol Immunol*. 2000; 37: 161-7

Bernard H, Paty E, Mondoulet L, Burks AW, Bannon GA, Wal JM, Scheinmann P. Serological characteristics of peanut allergy in children. *Allergy* 2003; 58(12): 1285-92

Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity. I: In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 730-7.

Bernhisel-Broadbent J, Strause D, Sampson HA. Fish hypersensitivity II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 622-9.

Berrens L. Neoallergens in heated pecan nut: products of Maillard-type degradation? *Allergy* 1996; 51(4): 277-8

Besler M, Steinhart H, et al. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756(1-2): 207-28.

Besselink MG, Timmermann HM, van Minnen LP, Akkermans LM, Gooszen HG. Prevention of infectious complications in surgical patients: potential role of probiotics. *Dig Surg* 2005; 22(4): 234-44

Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(6): 1077-81

Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA. Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(3): 517-23.

Beyer K, Bardina L, Grishina G, Sampson HA. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 154-9

Beyer K, Ellman-Grunther L, Jarvinen KM, Wood RA, Hourihane J, Sampson HA. Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 202-7

Beyer K, Jarvinen KM, Bardina L, Mishoe M, Turjanmaa K, Niggemann B, Ahlstedt S, Venemalm L, Sampson H. IgE-binding peptides coupled to a commercial matrix as a diagnostic instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 704-5

Bindslev-Jensen C, Briggs D, Osterballe M. Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature? *Allergy.* 2002; 57(8): 741-6.

Bischoff S, Mayer J, Wedemeyer J, Meier PN, Zeck-Kapp G, Wedi B, Kapp A, Cetin Y, Gebel M, Manns MP. Colonoscopic allergen provocation (COLAP): a new diagnostic approach for gastro-intestinal food allergy. *Gut* 1997; 40(745-53): 745-53.

Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(4): 516-20

Blais BW, Philippe L. Detection of hazelnut proteins in foods by enzyme immunoassay using egg yolk antibodies. *J Food Prot.* 2001; 64(6): 895-8

Blanchard SS, Gerrek M, Czinn S, Chelimsky G, Seaman D, Siegel C, Splawski J. Food protein sensitivity with partial villous atrophy after pediatric liver transplantation with tacrolimus immunosuppression. *Pediatr Transplant.* 2006; 10(4): 529-32

Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987; 79: 683-8.

Bock SA, Atkins FM. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 900-4

Bock SA, Atkins FM. Pattern of food hypersensitivity during sixteen years of double blind, placebo-controlled food challenges. *J Pediatr* 1990; 117: 561-7

Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 191-3

Bodinier M, Brossard C, Triballeau S, Morisset M, Guérin-Marchand C, Pineau F, de Coppet P, Moneret-Vautrin DA, Blank U, Denery-Papini S. Evaluation of an *in vitro* mast cell degranulation test in the context of food allergy to wheat. *Accepté pour International Archives of Allergy and Immunology- 2008*; 146(4): 307-20

Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer GF, Ebner C. Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to *Api g* 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3303-10

Bohle B, Radakovics A, Lüttkopf D, Jahn-Schmid B, Vieths S, Ebner C.Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(10): 1392-9

Bohle B, Zwölfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, Keller W, Zuidmeer L, van Ree R, Werfel T, Ebner C. Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(1): 242-9.

Bonness S, Bieber T. Molecular basis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7(5): 382-6

Bourne HC, Restani P, Moutzouris M, Katelaris CH. An unusual pattern of meat allergy. *Allergy* 2005; 60 (5): 706-7.

Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'byrne P, Sheffer A. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy* 2007; 62(2): 102-12

Boyano-Martinez T, Garcıa-Ara C, Dıaz-Pena JM, Martın-Esteban M. Prediction of tolerance on the basis of quantification of egg white-specific IgE antibodies in children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 304-9

Boyle RJ, Russo VC, Andaloro E, Mehr SM, Tang ML. Anaphylaxis to kangaroo meat: identification of a new marsupial allergen. *Allergy* 2007; 62(2): 209-11

Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Susani M, Ahorn H, Ebner C, Kraft D, Scheiner O. Molecular characterization of *Api g* 1, the major allergen of celery *(Apium graveolens)*, and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem* 1995; 233: 484-9.

Breiteneder H, Clare Mills EN: Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol Adv* 2005; 23: 395-9

Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-30

Brenna O, Pompei C, Ortolani C, Pravettoni V, Farioli L, Pastorello E. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar, *J Agric Food Chem* 2000; 48: 493-7

Brett GM, Bull VJ, Morgan MR. Identification of hidden allergens within foods. *Allergy* 1998; 53 (46): 109-10

Browne WJ, North AC, Phillips DC, Brew K, Vanaman TC, Hill RL. A possible three-dimensional structure of bovine α-lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme. *J Mol Biol*. 1969; 42: 65-86.

Bruno G, Giampietro PG, Del Guercio MJ, Gallia P, Giovannini L, Lovati C, Paolucci P, Quaglio L, Zoratto E, Businco L. Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8(4): 190-3.

Bublin M, Radauer C, Wilson IB,Kraft D, Scheiner O, BreitenederH, Hoffmann-Sommergruber K. Cross-reactive N-glycans of *Api g* 5, a highmolecular weight glycoprotein allergen from celery, are required for immunoglobulin E binding and activation of effector cells from allergic patients. *FASEB J* 2003; 17: 1697-9

Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, Kapiotis S, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca2+ depletion. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(1Pt 1): 67-74.

Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 172-9

Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm RM. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 962-9.

Burks AW, Cockrell G, Connaughton C, Guin J, Allen W, Helm RM. Identification of peanut agglutinin and soybean trypsin inhibitor as minor legume allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105:143-9

Burks AW, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA. Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J Clin Invest* 1995; 96: 1715-21

Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur J Biochem* 1997; 245: 334-9.

Bush RK, Taylor SL, Nordlee JA, Busse WW. Soybean oil is not allergenic to soybean-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 1985; 76(2 Pt 1): 242-5

Bushara KO, Goebel SU Shill H, Goldfarb LG, Hallett M. Gluten sensitivity in sporadic and hereditary cerebellar ataxia. *Ann Neurol* 2001; 49(4): 540-3

Byun MW, Kim JH, Lee JW, Park JW, Hong CS, Kang IJ. Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J Food Prot.* 2000; 63(7): 940-4.

Caballero T, Pascual C, Garcia-Ara MC, Ojeda JA, Martin-Esteban M. IgE cross-reactivity between mugwort pollen (Artemisia vulgaris) and hazelnut (Abellana nux) in sera from patients with sensitivity to both extracts. *Clin Exp Allergy* 1997; 27(10): 1203-11

Caffarelli C, Plebani A, Poiesi C, Petroccione T, Spattini A, Cavagni G. Determination of allergenicity to three cow's milk hydrolysates and amino acid derived formula in children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:74-9

Cahen YD, Fritsch R, Wüthrich B. Food allergy with monovalent sensitivity to poultry meat. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28(8): 1026-30

Canani RB, Ruotolo S, Auricchio L, Caldore M, Porcaro F, Manguso F, Terrin G, Troncone R. Diagnostic accuracy of the atopy patch test in children with food allergy-related gastrointestinal symptoms. *Allergy*. 2007; 62(7): 738-43

Cantani A, Ferrara M, RangoV, Businco L. Efficacy and safety of soy-protein-formula for feeding babies with atopic dermatitis and cow's milk hypersensitivity. *Euro. Rev. Med. Pharma. Sci*. 1990; 12: 311-8

Cantani A. Hidden presence of cow's milk proteins in foods. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1999; 9 (3): 141-5

Carnes J, Ferrer A, Fernandez-Caldas E. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006; 96(4): 564-70

Cartier A, Malo JL, Forest F, Lafrance M, Pineau L, St-Aubin JJ, Dubois JY. Occupational asthma in snow crab-processing workers. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 261-9

Cavataio F, Iacono G, Montalto G, Soresi M, Tumminello M, Carroccio A.Clinical and pH-metric characteristics of gastro-oesophageal reflux secondary to cows' milk protein allergy. *Arch Dis Child.* 1996; 75(1): 51-6

Chassaigne H, Nørgaard JV, van Hengel AJ. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *J Agric Food Chem.* 2007; 55(11): 4461-73

Chatchatee P, Jarvinen K, Bardina L, Beyer K, Sampson H. Identification of IgE- and IgG- binding epitopes on α S1-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 379-83.

Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31(8): 1256-62

Chen Z, Posch A, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 476-81

Christensen HR, Bruun SW, Frokiaer H. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132: 58-67.

Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc.* 2002; 102(11): 1648-51

Chu KH, Wong SH, Leung PS. Tropomyosin is the major mollusk allergen: reverse transcriptase polymerase chain reaction, expression and IgE reactivity. *Mar Biotechnol* 2000; 2: 499-509

Chua KY, Kehal PK, Thomas WR, Vaughan PR, Macreadie IG. High-frequency binding of IgE to the Der p allergen expressed in yeast. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992; *89:* 95-102

Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923; s: 163

Codex Alimentarius Commission, 2003. Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy 30 June-5 July 2003. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants and Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity: 47-60

Codreanu F, Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Guenard L, Rance F, Kanny G, Lemerdy P. The risk of systemic reactions to skin prick-tests using food allergens: CICBAA data and literature review. *Allerg Immunol* 2006; 38(2): 52-4

Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol* 1997; 159(4): 2026-32.

Constantin C, Huber WD, Granditsch G, Weghofer M, Valenta R. Different profiles of wheat antigens are recognised by patients suffering from coeliac disease and IgE-mediated food allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005; 138(3): 257-66.

Couturier P, Basset-Stheme D, Navette N, Sainte-Laudy J. [A case of coconut oil allergy in an infant: responsibility of "maternalized" infant formulas]. *Allerg Immunol (Paris)* 1994; 26 (10): 386-7

Cozon JNG, Dumas K, Gaujac D, Gutowski MC, Rozieres A, Brunet JL, Bienvenu J. Tests d'activation lymphocytaires CD69, CD25. Allergie aux médicaments II- tests immunobiologiques. John Libbey Eurotext, paris 2006 : 119-26

Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes" *Fund. Appl. Toxicol.* 1984; 6: 41-93.

Cuesta-Herranz J, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, De las Heras M, Duran C, Fernandez-Caldas E, de Miguel J, Vivanco F. Identification of cucumisin (*Cuc m 1*), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 827-33

Daher S, Tahan S Sole D, Naspitz CK, Da Silva Patricio FR, Neto UF, De Morais MB. Cow's milk protein intolerance and chronic constipation in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2001 12(6): 339-42.

Dalal I, Binson I, Reifen R, Amitai Z, Shohat T, Rahmani S, Levine A, Ballin A, Somekh E. Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy* 2002; 57: 362-5

Danneus A, Jhansson S, Foucard T, Ohman S. Clinical and immunological aspects of food allergy in childhood: estimation of IgG, IgA and IgE antibodies to food antigens in children with food allergy and atopic dermatitis. *Acta Paediatr Scand* 1977; 66: 31-7.

Das Dores S, Chopin C, Villaume C, Fleurence J, Gueant JL. A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (Gad mI) encoded by a gene distinct from that of Gad cI. *Allergy* 2002; 57 Suppl 72: 79-83.

Daul C, Morgan J, Lehrer S. 1990. The natural history of shrimp hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 488-93

Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 49-55.

Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 1998; 53: 102-5

Davoren M, Peake J Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis. *Arch Dis Child* 2005; 90(10): 1084-5

De Angelis M. Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I, Gobbetti M. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(1): 80-93

De Angelis M, Rizzello CG, Scala E, De Simone C, Farris GA, Turrini F, Gobbetti M. Probiotic preparation has the capacity to hydrolyze proteins responsible for wheat allergy. *J Food Prot.* 2007; 70(1): 135-44

de Boissieu D, Dupont C. L'allergie alimentaire du nourrisson: Manifestations digestives. *Allerg Immunol* 2000; 32(10): 378-80.

de Boissieu D, Dupont C. Time course of allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants. *J Pediatr* 2000; 136: 119-20

De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I, Gobbetti M. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(1): 80-93

De Angelis, Rizzello CG, Scala E, De Simone C, Farris GA, Turrini F, Gobbetti M. Probiotic preparation has the capacity to hydrolyze proteins responsible for wheat allergy. *J Food Prot* 2007; 70(1): 135-44

de Jong EC, van Zijverden M, Spanhaak S, Koppelman SJ, Pellegrom H, Penninks AH. Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 743-51.

Delaage M, Darmon M, Morel A. Dosage de l'histamine: utilisation d'un anticorps monoclonal pour un radioimmunoessai et un enzymoimmunoessai. *Allerg Immunol.* 1988; 20(9): 333-5

de Leon MP, Drew AC, Glaspole IN, Suphioglu C, Rolland JM, O'Hehir RE. Functional analysis of cross-reactive immunoglobulin E antibodies: peanut-specific immunoglobulin E sensitizes basophils to tree nut allergens. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(8): 1056-64

de Maat-Bleeker F, Van Dijk AG, Berrens L. Allergy to egg yolk possibly induced by sensitization to bird serum antigens. *Ann Allergy* 1985; 55: 245-8

de Martino M, Novembre E, Galli L, de Marco A, Botarelli P, Marano E, Vierucci A. Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86(6 Pt 1): 909-14

de Maat-Bleeker F, van Dijk AG, Berrens L. Allergy to egg yolk possibly induced by sensitization to bird serum antigens. *Ann Allergy* 1985; 54(3): 245-8

De Maat-Bleeker F, Stapel SO. Cross-reactivity between buckwheat and latex. *Allergy* 1998; 53(5): 538-9

Denery-Papini S, Lauriére M, Branlard G, Morisset M, Pecquet C, Choudat D, Merlino M, Pineau F, Popineau Y, Boulenc E, Bouchez-Mahiout I, Bodinier M, Moneret-Vautrin DA. Influence of the allelic variants encoded at the Gli-B1 locus, responsible for a major allergen of wheat, on IgE reactivity for patients suffering from food allergy to wheat. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(3): 799-805.

Des Roches A, Nguyen M, Paradis L, Primeau MN, Singer S. Tolerance to cooked egg in an egg allergic population. *Allergy* 2006; 61(7): 900-1.

Devenney I, Falth-Magnusson K. Skin prick tests may give generalized allergic reactions in infants. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 85: 457-60

DeWitt AM, Mattsson L, Lauer I, Reese G, Lidholm J. Recombinant tropomyosin from Penaeus aztecus (rPen a 1) for measurement of specific immunoglobulin E antibodies relevant in food allergy to crustaceans and other invertebrates. *Mol Nutr Food Res.* 2004; 48(5): 370-9

Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G.
Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:127-33

Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(10):1403-10.

Diaz-Perales A, Tabar AI, Sanchez-Monge R, Garcia BE, Gomez B, Barber D, Salcedo G. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 790-6

Díaz-Perales A, Sanz ML, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Lombardero M, Polo F, Gamboa PM, Barber D, Salcedo G. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(3): 628-33

Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1002-7

Dibbern DA Jr, Palmer GW, Williams PB, Bock SA, Dreskin SC. RBL cells expressing human Fc epsilon RI are a sensitive tool for exploring functional IgE-allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients. *J Immunol Methods.* 2003; 274(1-2): 37-45

Diez U, Kroessner T, Rehwagen M, Richter M, Wetzig H, Schulz R, Borte M, Metzner G, Krumbiegel P, Herbarth O.Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *Int J Hyg Environ Health.* 2000; 203(1): 23-8

Directive 2003/89/CE du Parlement Européen et du Conseil du 10 novembre 2003 modifiant la directive 2000/13/CE en ce qui concerne l'indication des ingrédients présents dans les denrées alimentaires. JO de l'Union Européenne 25/11/2003

Docena GH, Fernandez R, Chirdo FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996; 51(6): 412-6.

Dory D, Chopin C, Aimone-Gastin I, Gueant JL, Guerin L, Sainte-Laudy J, Moneret-Vautrin DA, Fleurence J. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. *Allergy* 1998; 53: 42-50

Dreborg S. Skin tests in diagnosis of food allergy. *Allergy Proc* 1991; 12: 251-4

Drouet M, Boutet S, Lauret MG, Chene J, Bonneau JC, Le Sellin J, Hassoun S, Gay G, Sabbah A. le syndrome porc-chat ou l'allergie croisée entre viande de porc et épithelia de chat (1). *Allerg Immunol* 1994; 26(5): 166-8

Drouet M, Sabbah A.The pork/cat syndrome or crossed reactivity between cat epithelia and pork meat. *Monogr Allergy* 1996; 32: 164-73

Drouet M, Sabbah A, Le Sellin J, Bonneau JC, Gay G, Anaphylaxie mortelle après ingestion de sanglier chez un patient porteur du syndrome porc-chat. *Alim'Inter* 2001; 6: 103-5.

Dupont C, Barau E, Molkhou P, Raynaud F, Barbet J. Food-induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk sensitive enteropathy and atopicdermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 8: 459-65

Dupont D, Muller-Renaud S. Quantification of proteins in dairy products using an optical biosensor. *J AOAC Int.* 2006; 89(3): 843-8

Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(1): 137-44

Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow cytometric analysis of in vitro activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005; 64(1): 28-33

Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE crossreactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:962-9

Ebner C, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy* 2001; 56 Suppl 67: 43-4.

Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. *Allergy* 2001; 56: 403-11.

Eggesbo M, Botten G, Stigum H, Nafstad P, Magnus P. Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(2): 420-6.

Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen β-lactoglobulin, *J Agric Food Chem* 2004; 52**:** 398–1403

Eigenmann PA, Huang SK, Sampson HA. Characterization of ovomucoid-specific T-cell lines and clones from egg-allergic subjects. *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7(1):12-21

Eigenmann PA, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 969-78.

Elsayed S, Aas K. Observations on effect of denaturation on the allergenic activity. *J Allergy*. 1971; 47(5): 283-91

Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 1975; 4: 203-8

Elsayed S, Apold J. Allergenic structure of allergen M from cod. II. Allergenicity of the limited tryptic hydrolysis peptides of fragment TM 2. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1977; 54(2): 171-5.

Elsayed S, Apold J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M: locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy* 1983 ; 38, 449-59

Enache-Engoulvant A, Hennequin C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin infect Dis* 2005; 41(11): 1559-68

Erdmann SM, Sachs B, Schmidt A, Merk HF, Scheiner O, Moll-Slodowy S, Sauer I, Kwiecien R, Maderegger B, Hoffmann-Sommergruber K. In vitro analysis of birch-pollen-associated food allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005; 136(3): 230-8

Errahali Y, Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Metche M, Nicolas JP, Fremont S Allergen in soy oils. *Allergy* 2002; 57(7): 648-9.

Esch RE. Allergen source materials and quality control of allergenic extracts. *Methods* 1997, *13:* 2-13.

Etienne M, Jerome M, Fleurence J, Rehbein H, Kundiger R, Mendes R, Costa H, Perez-Martin R, Pineiro-Gonzalez C, Craig A, Mackie I, Malmheden Yman I, Ferm M, Martinez I, Jessen F, Smelt A, Luten J. Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: a collaborative study. J Agric Food Chem. 2000; 48(7): 2653-8.

ESPGAN Committee on Nutrition. Comment on antigen-reduced infant formula. *Acta Paediatr* 1993; 82: 314-9

European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993; 186(1): 23-31

Ewan PW. Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: new features and associations. *BMJ* 1996; 312: 1074-8

Exl B-M, Fritsché R: Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutr* 2001; 17: 642-51.

FAO- le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO 1998: Alimentation et nutrition n° 28. ISBN 92-5-20534-6

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report*, 2001; 1-34

Favier JC, Irelant-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Répertoire général des aliments. INRA Editions Lavoisier Tec-Doc 2ème Ed. 1995

Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 1997; 5:33-45
Fernandez C, Fiandor A, Martinez-Garate A, Martinez Quesada J. Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clin Exp Allergy* 1995; 25(12):1254-9
Fernandes J, Reshef A, Patton L, *et al*. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:956-961
Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59 (3): 243-67.
Ferrer A, Marco FM, Andreu C, Sempere JM. Occupational asthma to carmine in a butcher. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005; 138(3): 243-50
Ferrer A, Carnés J, Gallego MT, Andréu C, Fernández-Caldas E. Characterization and improvement of apple extracts for the diagnosis of apple IgE-mediated allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 95(5): 462-7

Figueredo E, Cuesta-Herranz J, De-Miguel J, Lazaro M, Sastre J, Quirce S, Lluch-Bernal M, De las Heras M. Clinical characteristics of melon (Cucumis melo) allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91(3): 303-8

Findlay JB, Brew K. The complete amino-acid sequence of human α -lactalbumin. *Eur J Biochem* 1972; 27: 65-86

Fiocchi A, Restani P, Riva E, Qualizza R, Bruni P, Restelli AR et al. Meat allergy I: Specific IgE to BSA and OSA in atopic, beef sensitive children. *J Am Coll Nutr* 1995; 14: 239-44.

Fiocchi A, Restani P, Fiocchi A, Restani P, Leo G, Martelli A, Bouygue GR, Terracciano L, Ballabio C, Valsasina R. Clinical tolerance to lactose in children with cow's milk allergy. *Pediatrics* 2003; 112(2): 359-6

Fleischer DM, Conover-Walker MK, Matsui EC, Wood RA. The natural history of tree nut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(5): 1087-93

Flinterman AE, Pasmans SG, Hoekstra MO, Meijer Y, van Hoffen E, Knol EF, Hefle SL, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC. Determination of no-observed-adverse-effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 448-54

Floistrup H, Swartz J, Bergstrom A, Alm JS, Scheynius A, van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M, Zutavern A, von Mutius E, Ublagger E, Riedler J, Michaels KB, Pershagen G, The Parsifal Study Group.Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(1):59-66.

Ford R, Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. *Arch Dis Child* 1982; 57: 649-52.

Foucard T, Malmheden Yman I. A study on severe food reactions in Sweden—is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis? *Allergy* 1999; 54: 261-5

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-De-Sa MF. Plant alphaamylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. *Eur J Biochem* 2002; 269: 397-412

Franck P, Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Kanny G, Megret-Gabeaux ML, Olivier JL. Anaphylactic reaction to inulin: first identification of specific IgE to an inulin protein compound. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136(2): 155-8

Franklin W. Latex as a food allergen. *N Engl J Med* 1999; 341:18-58

Frémont S, Morisset M, Gérard P, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. [Measurement of levels of specific IgE by the Efficient New Enzymatic Allergy (ENEA) System II (CIS bio)]. *Allerg Immunol* (Paris) 1999; 31(8): 278-84

Frémont S, Kanny G, Bieber S, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Identification of a masked allergen, alpha-lactalbumin, in baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. *Allergy* 1996; 51(10): 749-54.

Frémont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. *Allergy* 1997; 52: 224-8.

Freye HB, Esch RE, Litwin CM, Sorkin L. Anaphylaxis to the ingestion and inhalation of *Tenebrio molitor* (Mealworm) and Zophobas morio (Superworm). *Allergy Asthma Proc* 1996; 17: 215-9

Fries JH. Chocolate: a review of published reports of allergic and other deleterious effects, real or presumed. *Ann Allergy* 1978. 41(4): 195-207.

Fritsch R, Bohle B, Vollmann U, Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Krebitz M, Breiteneder H, Kraft D, Ebner C. *Bet v* 1, the major birch pollen allergen, and *Mal d* 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 679-86

Fuentes M, Palacios R, Garcés M, Caballero ML, Moneo I. Isolation and characterization of a heat-resistant beef allergen: myoglobin. *Allergy* 2004; 59 (3): 327-31

Fujita C, Moriyama T, Ogawa T. Identification of cyclophilin as an IgEbinding protein from carrots. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 44-50

Fuller R. Probiotics: The Scientific Basis. Chapman and Hall, Landon. 1992

Gall H, Kalveram KJ, Forck G, Sterry W. Kiwi fruit allergy: a new birch pollen-associated food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 70-6

Gamboa PM, Caceres O, Antepara I, Sanchez-Monge R, Ahrazem O, Salcedo G, Barber D, Lombardero M, Sanz ML. Two different profiles of peach allergy in the north of Spain. *Allergy* 2007; 62(4): 408-14
Garcia-Ara MC, Boyano-Martinez MT, Diaz-Pena JM, Martin-Munoz MF, Martin-Esteban M: Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 866-70

Garcia-Casado G, Armentia A, Sanchez-Monge R, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Salcedo G. A major baker's asthma allergen from rye flour is considerably more active than its barley counterpart. *FEBS Lett* 1995; 364:36-40

García-Sellés FJ, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R, Alcántara M, Lombardero M, Barber D, Salcedo G, Fernández-Rivas M. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and Artemisia pollen: an in vivo study. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 128(2): 115-22

Gaspar A, Neto-Braga C, Pires G, Murta R, Morais-Almeida M, Rosado-Pinto J. Anaphylactic reaction to manioc: cross-reactivity to latex. *Allergy* 2003; 58(7): 683-4

Gay-Crosier F, Schreiber G, Hauser C. Anaphylaxis from inulin in vegetables and processed food. *N Engl J Med.* 2000; 342(18): 1372.

Gay-Grosier F, Schreiber G, Hauser C. Anaphylaxis from inulin in vegetables and processed food. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1372

Gendel SM, Jenkins JA. Allergen sequence databases. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50(7): 633-7

Gern JE, Yang E, Evrard HM, Sampson HA. Allergic reactions to milk contaminated "nondairy" products. *N Engl J Med*. 1991; 324(14): 976-9

Gennaro AR, Editeur, *Remington's pharmaceutical sciences*. Mack Publishing Co., Easton (PA) (18eme ed.), 1980: 1322-3

Gern JE, Yang E, Evrard HM, Sampson HA. Allergic reactions to milk-contaminated 'non-dairy' products. *N Engl J Med* 1991; 324: 976-9

Gjesing B, Østerballe O, Schwartz B, Wahn U, Løweinstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 1986, 41**:** 51-6

Goetz DW, Whisman BA, Goetz AD.Cross-reactivity among edible nuts: double immunodiffusion, crossed immunoelectrophoresis, and human specific igE serologic surveys. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005; 95(1): 45-52

Goh DL, Lau YN, Chew FT, Shek LP, Lee BW. Pattern of food-induced anaphylaxis in children of an Asian community. *Allergy* 1999; 54: 84-6
Goh LM, Immunochemical characterization of edible bird's nest allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 1082-8.
Gonzalez R, Polo F, Zapatero L, Caravaca F, Carreira J. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 748-55.

Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50(7): 655-60.

Grundy J, Matthews S, Bateman B, Dean T, Arshad SH. Rising prevalence of allergy to peanut in children: data from 2 sequential cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(5):784-9.

Gu X, Beardslee T, Zeece M, Sarath G, Markwell J. Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 218-25

Guerin L, Leduc V, Chabane H. *Traité d'Allergologie.*Vervloet D & Magnan A. Médecine Sciences. Flammarion. Ed 2003, 66 : 939-56

Guerin-Dubiard C, Pasco M, Molle D, Desert C, Croguennec T, Nau F. Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(11): 3901-10

Guinnepain MT, Eloit C, Raffard M, Brunet-Moret MJ, Rassemont R, Laurent J. Exercise-induced anaphylaxis: useful screening of food sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77(6): 491-6.

Hadjivassiliou M, Grunewald RA Davies-Jones GA. Gluten sensitivity as a neurological illness. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72(5): 560-3

Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroofe NM, Korponay-Szabó IR.Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* 2006; 66(3):373-7

Hafstrom I, Ringertz B et al. , Spangberg A, von Zweigbergk L, Brannemark S, Nylander I, Ronnelid J, Laasonen L, Klareskog L. A vegetarian diet free of gluten improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: the effects on arthritis correlate with a reduction in antibodies to food antigens. *Rheumatology* 2001; 40(10): 1175-9.

Halmepuro L, Salvaggio JE, Lehrer SB. Crawfish and lobster allergens: identification and structural similarities with other crustacea. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1987; 84(2):165-72

Hamada Y, Tanaka H, Ishizaki S, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergen of mackerels. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(8):1149-56.

Hamberger C, Guilloux L. Les méthodes de recherché des IgE spécifiques. *Spectra Biol* 2003; 22(134): 48-54

Hansen TK, Bindslev-Jensen C, Stahl Skov P, Poulsen LK. Codfish allergy in adults: IgE cross-reactivity among fish species. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 78: 187-94

Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Luttkopf D, Skov PS, Wuthrich B, Bindslev-Jensen C, Vieths S, Poulsen LK. Roasted hazelnuts—allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 2003; 58: 132-8

Hansen TK, Poulsen LK, Stahl Skov P, Hefle SL, Hlywka JJ, Taylor SL, Bindslev-Jensen U, Bindslev-Jensen C. A randomized, double-blinded, placebo-controlled oral challenge study to evaluate the allergenicity of commercial, food-grade fish gelatin. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(12): 2037-44

Harada S, Horikawa T, Icihashi M. [A study of food-dependent exercise-induced anaphylaxis by analyzing the Japanese cases reported in the literature]. *Arerugi* 2000; 49(11): 1066-73

Hartz C, San Miguel-Moncín Mdel M, Cisteró-Bahíma A, Fötisch K, Metzner KJ, Fortunato D, Lidholm J, Vieths S, Scheurer S. Molecular characterisation of *Lac s* 1, the major allergen from lettuce (Lactuca sativa). *Mol Immunol.* 2007; 44(11): 2820-30

Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2004; 4(4): 89-98

Hefle SL. Hidden food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001;* 1 (3): 269-71.

Hefle SL, Lambrecht DM. Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail and milk-allergic complaint foods. *J Food Prot.* 2004; 67(9): 1933-8.

Hefle SL, Furlong TJ, Niemann L, Lemon-Mule H, Sicherer S, Taylor SL. Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *Allergy Clin Immunol* 2007; 120 (1): 171-6

Heine RG, Verstege A, Mehl A, Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Niggemann B. Proposal for a standardized interpretation of the atopy patch test in children with atopic dermatitis and suspected food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17(3): 213-7

Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, et al. A soybean G2 glycinin allergen: 2. epitope mapping and three-dimensional modeling. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000; 123: 213-9.

Helm RM, Cockrell G, Herman E, Burks AW, Sampson HA, Bannon GA. Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 29-37

Hemmer W, Focke M, Gotz M, Jarisch R. Sensitization to Ficus benjamina: relationship to natural rubber latex allergy and identification of foods implicated in the Ficus-fruit syndrome. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(8):1251-8

Herian AM, Taylor SL, Bush RK. Allergenic reactivity of various soybean products as determined by RAST inhibition. *J Food Sci* 1993; 58: 385-8.

Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, Hentges F. Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: definition of alpha-parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy* 2002; 57(11): 1053-8

Hilger C, Thill L, Grigioni F, Lehners C, Falagiani P, Ferrara A, Romano C, Stevens W, Hentges F. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 2004; 59(6): 653-60

Hill DJ. Cow's milk allergy in infants: some clinical and immunologic features *J Pediatr 1986;* 57(3): 225-8

Hill SM, Milla PJ. Colitis caused by food allergy in infants. *Arch Dis Child.* 1990; 65(1):132-3.

Hill DJ, Cameron DJ, Francis DE, Gonzalez-Andaya AM, Hosking CS. Challenge confirmation of late-onset reactions to extensively hydrolyzed formulas in infants with multiple food protein intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(3): 386-94

Hill DJ, Hosking CS, Zhie CY, Leung R, Baratwidjaja K, Iikura Y, Iyngkaran N, Gonzalez-Andaya A, Wah LB, Hsieh KH: The frequency of food allergy in Australia and Asia.*Environ Toxicol Pharmacol* 1997; 4: 101-10.

Hill DJ, Hosking CS, Heine RG. Clinical spectrum of food allergy in children in Australia and South-East Asia: identification and targets for treatment. *Ann Med* 1999; 31(4): 272-8

Hill DJ, Heine RG, Cameron DJ, Francis DE, Bines JE. The natural history of intolerance to soy and extensively hydrolyzed formula in infants with multiple food protein intolerance. *J Pediatr* 1999

Hill DJ, Heine RG, Hosking CS. The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 435-41

Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, Barletta B, Becker WM, Blaser K, Breiteneder H, Chapman M, Crameri R, Duchêne M, Ferreira F, Fiebig H, Hoffmann-Sommergruber K, King TP, Kleber-Janke T, Kurup VP, Lehrer SB, Lidholm J, Müller U, Pini C, Reese G, Scheiner O, Scheynius A, Shen HD, Spitzauer S, Suck R, Swoboda I, Thomas W, Tinghino R, Van Hage-Hamsten M, Virtanen T, Kraft D, Müller MW, Valenta R. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J.* 2002; 16: 414-6

Hindley J, Wunschmann S, Satinover SM, Woodfolk JA, Chew FT, Chapman MD, Pomes A. *Bla g 6*: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117: 1389-95

Hirao T, Imai S, Sawada H, Shiomi N, Hachimura S, Kato H. PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum spp*.) in food *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69:724-31

Hlywka JJ, Hefle SL, Taylor SL.A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *J Food Prot.* 2000; 63(2): 252-7

Ho MH, Heine RG, Wong W, Hill DJ. Diagnostic accuracy of skin prick testing in children with tree nut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1506-8

Hoffman DR. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J Allergy Clin Immunol.* 1983; 71(5): 481-6

Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1953; 1: 928-43

Hoffmann A, Jamin A, May S, Haustein D, Vieths SA. New in vitro model for testing of food allergens: allergen specific mediator release of passively sensitised rat basophil leukaemia cells. *Food Agric Immunol*, 1997; 9: 309-25

Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Laimer Da Camara Machado M, Puhringer H, Scheiner O, Breiteneder H. Molecular characterization of *Dau c 1*, the *Bet v 1* homologous protein from carrot and its cross-reactivity with *Bet v 1* and *Api g 1*, *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 840-7.

Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 930-5

Holen E, Elsayed S. Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/ SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1990; 91:136-41

Holen E, Elsayed S. Specific T cell lines for ovalbumin, ovomucoid, lysozyme and two OA synthetic epitopes, generated from egg allergic patients' PBMC. *Clin Exp Allergy* 1996; 26(9):1080-8.

Holen E, Bolann B, Elsayed S. Novel B and T cell epitopes of chicken ovomucoid (*Gal d 1*) induce T cell secretion of IL-6, IL-13, and IFN-gamma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(6): 952-64.

Holzhauser D, Dehne LI, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. *Z Lebensm-Unters Forsch A* 1998; 206:1-8

Holzhauser T, Vieths S. Quantitative sandwich ELISA for determination of traces of hazelnut (*Corylus avellana*) protein in complex food matrixes. *J Agric Food Chem* 1999; 47(10): 4209-18.

Holzhauser T, Vieths S. Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (Arachis hypogaea L.) protein in complex food matrices. *J Agric Food Chem* 1999; 47(2): 603-11.

Holzhauser T, Stephan O, Vieths S. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem* 2002; 50:5808-15

Hori H, Hattori S, Inouye S, Kimura A, Irie S, Miyazawa H, Sakaguchi M Analysis of the major epitope of the alpha2 chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(4): 652-7

Host A. Halken S. Epidemiology and prevention of cow's milk allergy. *Allergy*. 1998; 53 (46 suppl): 111-3

Host A, Koletzko B, Dreborg S, Muraro A, Wahn U, Aggett P, Bresson JL, Hernell O, Lafeber H, Michaelsen KF, Micheli JL, Rigo J, Weaver L, Heymans H, Strobel S, Vandenplas Y. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch Dis Child*. 1999; 81(1): 80-4

Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life: clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990; 45: 587-96.

Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ* 1996; 313: 518-21

Hourihane JOB, Kilburn SA, Nordlee JA, Hefle SL, Taylor SL. An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 596-600

Hourihane JO, Roberts SA, Warner JO. Resolution of peanut allergy: case-control study. *Br Med J*. 1998; 316: 1271-5.

Hourihane JO'B, Harris H, Langton-Hewer S. Clinical features of cashew allergy. *Allergy* 2001; 56: 252-3.

Hsieh LS, Moos M Jr, Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 96(6 Pt 1): 960-70

Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2002;47: 2625-34.

Hubner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int.* 2001; 84(6): 1855-64

Huggett AC, Hischenhuber C. Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy* 1998; 53 (Suppl. 46): 89-92

Huibregtse IL, Snoeck V, de Creus A, Braat H, De Jong EC, Van Deventer SJ, Rottiers P. Induction of Ovalbumin-Specific Tolerance by Oral Administration of *Lactococcus lactis* Secreting Ovalbumin. *Gastroenterology* 2007; 133: 517-28

Hultschig C, Kreutzberger J, Seitz H, Konthur Z, Büssow K, Lehrach H. Recent advances of protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol.*; 10(1): 4-10

Hurst W, Krout J, Burks WR. A comparison of commercially available peanut ELISA test kits on the analysis of samples of dark and milk chocolate. *J Immunoassay Immunochem* 2002; 23(4) : 451-9

Iacono G, Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, Soresi M, Balsamo V. Use of ass' milk in multiple food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14(2):177-81

Indyk HE, Filonzi EL. Direct optical biosensor analysis of folate-binding protein in milk. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(11): 3253-8

Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Tropomyosin, the major oyster *Crassostrea gigas* allergen and its IgE-binding epitopes. *J Food Sci* 1998; 63: 44-7

Ishikawa M, Ishida M, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Purification and IgE-binding epitopes of a major allergen in the gastropod *Turbo cornutus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62: 1337-43

Isolauri E, Turjanmaa K. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 9-15

Jacquenet S, Moneret-Vautrin DA. Les allergènes de l'arachide et des fruits à coque *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2007; 47 : 487-91

James JM, Sixbey JP, Helm RM, Bannon GA, Burks AW. Wheat α-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 239-44

Järvinen K-M, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on α-lactalbumin and β-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126:111-8.

Jankiewicz A, Baltes W, Bo¨gl KW, Dehne LI, Jamin A, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *J Sci Food Agric* 1997; 75:359-70.

Jankiewicz A, Baltes W, Bo¨gl KW, Dehne LI, Jamin A, Hoffmann A, Hoffmann A**,** Haustein D**,** Vieths S**.** In vitro study of the gastrointestinal stability of celery allergens. *Food Agric Immunol* 1997; 9: 203-17

Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; 126(2): 111-8

Jenkins JA, Griffiths-Jones S, Shewry PR, Breiteneder H, Mills EN. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(1): 163-70

Jenkins JA, Breiteneder H, Mills EN. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(6): 1399-405

Jiang B, Qu H, Hu Y, Ni T, Lin Z Computational analysis of the relationship between allergenicity and digestibility of allergenic proteins in simulated gastric fluid. *BMC Bioinformatics* 2007; 8(1): 375-86

Johansson SGO, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, M. Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B. Position paper. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001: 56: 813-24

Jones RT, Squillace DL, Jones RT, Squillace DL, Yunginger JW. Anaphylaxis in a milk-allergic child after ingestion of milk-contaminated kosher-pareve-labeled "dairy-free" dessert.
Ann Allergy 1992; 68(3): 223-7

Kagan RS, Joseph L, Dufresne C, Gray-Donald K, Turnbull E, Pierre YS, Clarke AE. Prevalence of peanut allergy in primary-school children in Montreal, Canada. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(6): 1223-8

Kalach N, Soulaines P, de Boissieu D, Dupont C. A pilot study of the usefulness and safety of a ready-to-use atopy patch test (Diallertest) versus a comparator (Finn Chamber) during cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(6): 1321-6

Kallioaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357(9262): 1076-9

Kallioaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9372): 1869-71.

Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN. Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol* 1985; 182:317-29

Kanny G, Puygrenier J, Beaudouin E, Moneret-Vautrin DA. Choc anaphylactique alimentaire: implication des résidus de pénicilline. *Allerg Immunol* (Paris). 1994; 26(5):181-3.

Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(1): 133-40.

Kanny G, Chenuel B, Moneret-Vautrin DA. Chronic urticaria to wheat. *Allergy* 2001; 56(4): 356-7

Karamloo F, Wangorsch A, Kasahara H, Davin LB, Haustein D, Lewis NG, et al. Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Eur J Biochem* 2001; 268:5310-20.

Karunananthan CG, Kim HL, Kim JH. An unusual case of bilateral auriculotemporal syndrome presenting to an allergist. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89(1): 104-5.

Kelso JK, Jones RT, Yunginger JW. Monospecific allergy to swordfish. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1996; 77: 227-8

Kelso JM, Bardina L, Beyer K. Allergy to canned tuna. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(4): 901

Kiening M, Niessner R, Drs E, Baumgartner S, Krska R, Bremer M, Tomkies V, Reece P, Danks C, Immer U, Weller MG. Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3321-7

Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, Lee S, Noh G. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med*. 2002; 34(2): 152-8.

Kirjavainen PV, Salminen SJ, Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36(2): 223-7.

Kleber-Janke T, Crameri R, Appenzeller U, Schlaak M, Becker WM. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 265-74

Kleber-Janke T, Crameri R, Scheurer S, Vieths S, Becker WM. Patienttailored cloning of allergens by phage display: peanut (Arachis hypogaea) profilin, a food allergen derived from a rare mRNA. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;756: 295-305

Klein-Tebbe J, Wangorsch A, Vogel L, Crowell DN, Haustein UF, Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J Allergy Clin Immunol* 2002 110: 797–804.

Klemola T, Vanto T, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Korpela R, Varjonen E. Allergy to soy formula and extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy with a follow-up to the age of 2 years. *J. Pediatr*. 2002; 140: 219-24

Ko TP, Day J, McPherson A. The refined structure of canavalin from jack bean in two crystal forms at 2.1 and 2.0 A resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; 56: 411-20

Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama R, Sugimura T, Yamamoto K. In vitro and in vivo anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med*. 2004; 14(5): 879-84

Kobayashi M, Hashimoto Y, Taniuchi S, Tanabe S. Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce. *Int J Mol Med.* 2004; 13(6): 821-7

Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 2006; 61(3): 357-63

Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Yokoyama Y. Proliferative responses of lymphocytes to food antigens are useful for detection of allergens in nonimmediate types of food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1997; 7(2): 122-6

Koppelman SJ, Wensing M, de Jong GA, Knulst AC. Anaphylaxis caused by the unexpected presence of casein in salmon. *Lancet.* 1999; 354(9196): 2136

Koppelman SJ, Knulst AC, Koers WJ, Penninks AH, Peppelman H, Vlooswijk R, Pigmans I, van Duijn G, Hessing M Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. *J Immunol Methods* 1999; 229: 107-20

Koppelman SJ, Knol EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle SL, Gruppen H, Piersma S. Peanut allergen *Ara h 3*: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 2003; 58: 1144-51

Koppelman J, Bleeker-Marcelis H, Duijn G, Hessing M. Detecting peanut allergens. The development of an immunochemical assay for peanut proteins. *World of Ingredients* 1996; 12, 35-8

Koyama H, Kakami M, Kawamura M, Tokuda R, Kondo Y, Tsuge I, Yamada K, Yasuda T, Urisu A. Grades of 43 fish species in Japan based on IgE-binding activity. *Allergol Int.* 2006; 55(3): 311-6

Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M, et al. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (Malus domestica), and its characterization as an antifungal protein. *J Mol Biol* 2003; 329:721-30

Kruisselbrink A, Heijne Den Bak-Glashouwer MJ, Havenith CE, Thole JE, Janssen R. Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T-cell responses. *Clin Exp Immunol* 2001; 126(1): 2-8

Kubota Y, Imayama S, Toshitani A, Miyahara H, Tanahashi T, Uemura Y, Koga T, Sugawara N, Kurimoto F, Hata K. Sulfidoleukotriene release test (CAST) in hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997; 114(4): 361-6

Kulig M, Luck W, Lau S, Niggemann B, Bergmann R, Klettke U, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U. Effect of pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first 3 years of life. Multicenter Allergy Study Group, Germany. *Allergy* 1999; 54(3): 220-8.

Kulkarni-Kale U, Bhosle S, Kolaskar AS. CEP: a conformational epitope prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2005;33 (Web Server issue):W168-71

Kunz B, Oranje AP, Labreze L, Stalder JF, Ring J, Taieb A Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1997; 195(1): 10-9

Lachance P., Cartier A., Dolovich J., Malo J.L. – Occupational asthma from reactivity to an alkaline hydrolysis derivative of gluten. *J. Allergy Clin. lmmunol.* 1988, 81, 385-90

Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J; Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med*. 2003; 348(11): 977-85.

Lagrue G, Laurent J Rostoker G. Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl* 1989; 27: S147-51.

Langland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. III. Allergens In hen's egg white studied by crossed radio-immunoelectrophoresis. *Allergy* 1982; 37: 521-30.

Laoprasert N, Wallen ND, Jones RT, Hefle SL, Taylor SL, Yunginger JW. Anaphylaxis in a milk-allergic child following ingestion of lemon sorbet containing trace quantities of milk. *J Food Prot* 1998; 61(11): 1522-4.

Larramendi CH, Marco FM, García-Abujeta JL, Mateo M, de la Vega A, Sempere JM. Acute allergic reaction to an iron compound in a milk-allergic patient. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17(3): 230-3

Larsen EH, Andersen NL, Møller A, Petersen A, Mortensen GK, Petersen J. Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Addit Contam*. 2002; 19(1): 33-46

Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 593-626

Lavaud F, Cossart C, Reiter V, Bernard J, Deltour G, Holmquist I. Latex allergy in patient with allergy to fruit. *Lancet* 1992; 339(8791): 492-3

Lawrence MC, Izard T, Beuchat M, Blagrove RJ, Colman PM. Structure of phaseolin at 2.2 A resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J Mol Biol* 1994; 238: 748-76

Leduc V, Demeulemester C, Polack B, Guizard C, Le Guern LPeltre G. Immunochemical detection of egg-white antigens and allergens in meat products. *Allergy*1999; 54(5): 464-72

Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Guerin L, Morisset M, Kanny G. Anaphylaxis to wheat isolates: Immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4): 897-9

Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JTC, Morisset M, Guerin L, Kanny G. Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients. *Allergy* 2006: 61: 349-56

Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang KO, Lee SY, Hwang HJ, Byun MW. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot.* 2001; 64(2): 272-6.

Lee JW, Lee KY, Yook HS, Lee SY, Kim HY, Jo C, Byun MW. Allergenicity of hen's egg ovomucoid gamma irradiated and heated under different pH conditions. *J Food Prot.* 2002; 65(7): 1196-9.

Lee LA, Burks W. Food Allergies: Prevalence, Molecular Characterization, and Treatment/Prevention Strategies. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 539-65

Lee SK, Kniker WT, Cook CD, Heiner DC. Cow's milk-induced pulmonary disease in children. *Adv Pediatr* 1978; 25: 39-57

Lee TT, Morisset M, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, Codreanu F, Bihain BE, Kanny G. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(3): 746-7

Lehto M, Palosuo K, Varjonen E, Majuri ML, Andersson U, Reunala T, Alenius H. Humoral and cellular responses to gliadin in wheat-dependent, exercise- induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(1): 90-5

Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol* (NY) 2003; 5(4): 339-48

Lerch M, Egger C, Bircher AJ. Allergic reactions to macadamia nut. *Allergy* 2005; 60: 130-1

Leszczynska J, Lacka A, Szemraj J, Lukamowicz J, Zegota H. The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology* 2003; 217(5): 387-91

Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Aftab A, Bandea CI, Kwan HS, Nagy SM, Gershwin ME. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 92: 837-45

Leung PS, Chow WK, Duffey S, Kwan HS, Gershwin ME, Chu KH. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 954-61

Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1998; 7: 12-20

Leung PS, Chen Y, Gershwin MR, Wong SH, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 847-52

Levin ME, Motala C, Lopata AL. Cross-contaminated with cow's milk protein anaphylaxis in a milk-allergic child after ingestion of soy formula. *Pediatrics* 2005; 116: 1223-5

Li XM, Kleiner G, Huang CK, Lee SY, Schofield B, Soter NA, Sampson HA. Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(4): 693-702
Lim DLC, Neo KH, Goh DLM, Shek LPC, Lee BW. Missing parvalbumin: implications in diagnostic testing for tuna allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 : 874-5

Lin RY, Shen HD, Han SH. Identification and characterization of a 30 kd major allergen from Parapenaeus fissurus. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 92(6): 837-45.

Lindstrøm CDV, Van Do T, Hordvik I, Endresen C, Elsayed S. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scand. J. Immunol* 1996; 44: 335-44.

Lintu P, Savolainen J, Kalimo K, Kortekangas- Savolainen O, Nermes M, Terho EO. Cross-reacting IgE and IgG antibodies to *Pityrosporum ovale* mannan and other yeasts in atopic dermatitis. *Allergy* 1999; 54(10): 1067-73

Llátser R, Polo F, De La Hoz F, Guillaumet B. Alimentary allergy to pork. Crossreactivity among pork kidney and pork and lamb gut. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28(8): 1021-5

Lockey SD, Sr. Reactions to hidden agents in foods, beverages and drugs. *Ann Allergy* 1971; 29 (9): 461-6

Lopata AL, Zinn C, Potter PC. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal-m-1) in abalone (Haliotis midae). *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 642-648

Lubin David. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28. Bibliothèque David FAO, Rome. Edition 1995. ISBN 92-5-20534-6

Luttkopf D, Muller U, Skov PS, Ballmer-Weber BK, Wuthrich B, Skamstrup Hansen K, Poulsen LK, Kastner M, Haustein D, Vieths S. Comparison of four variants of a major allergen in hazelnut (Corylus avellana) Cor a 1.04 with the major hazel pollen allergen Cor a 1.01. *Mol Immunol.* 2002; 38(7):515-25.

Luyasu S, Morisset M, Guenard L, Moneret-Vautrin DA. Acute recurrent otalgia and food allergy: a case report and review of the literature. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 37(2): 60-2

Madsen C. Prevalence of food allergy / intolerance in Europe. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997; 4: 163-7.

Madsen C. Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(4): 413-7.

Magnolfi CF, Zani G, Lacava L, Patria MF, Bardare M. Soy allergy in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77:197-201.

Maher B. How it works: the real time PCR. *The Scientist* 2006; 20(12): 68

Mahler V, Vrtala S, Kuss O, Diepgen TL, Suck R, Cromwell O, Fiebig H, Hartl A, Thalhamer J, Schuler G, Kraft D, Valenta R. Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(1): 115-22

Maillard LC. *Genèse des matières humiques et des matières protéiques*. Ed Masson 1913; 8, XI

Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(2): 179-85

Majamaa H, Moisio P, Holm K, Turjanmaa K. Wheat allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE. *Allergy* 1999, 54(8): 851-6

Makinen-Kiljunen S, Palosuo T. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy* 1992; 47(4 Pt 2):347-52

Malandain H. IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Allerg Immunol*. 2005; 37(4):122-8

Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA. Structure of the major peanut allergen *Ara h 1* may protect IgE binding epitopes from degradation. *J Immunol* 2000; 164 (11): 5844-9

Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, Dodo H, Champagne ET, Chung SY, Landry SJ. The major peanut allergen,

Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(1): 190-5.

Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, Dodo H, Champagne ET, Chung SY, Landry SJ. The major peanut allergen, *Ara h 2*, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (1): 190-5

Malmheden-Yman I, Eriksson A, Everitt G, Yman L, Karlsson T. Analysis of Food proteins for verifications of contamination or mislabeling. *Food Agric Immunol* 1994; l 6: 167-72

Malmheden-Yman I, Eriksson A, Johansson MA, Hellenäs KE. Food allergen detection with biosensor immunoassays. *J AOAC* Int. 2006; 89(3): 856-61

Malo JL, Chretien P, McCants M, Leherer SB. Detection of snow-crab antigens by air sampling of a snow-crab production plant. *Clin Exp Allergy* 1997; 27 (1):75-8

Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen *Bet v 1* and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 2003; 325 (1): 123-33

Martínez San Ireneo M, Ibáñez Sandín MD, Fernández-Caldas E, Marañón F, Muñoz Martínez MC, Laso Borrego MT. The diagnostic value of crude or boiled extracts to identify tolerant versus nontolerant lentil-sensitive children. Ann Allergy Asthma Immunol. 2001; 86(6): 686-90

Maruyama N, Ichise K, Katsube T, Kishimoto T, Kawase S, Matsumura Y, Takeuchi Y, Sawada T, Utsumi S. Identification of major wheat allergens by means of the Escherichia coli expression system. *Eur J Biochem* 1998; 255 (3):739-45

Maruyama N, Adachi M, Takahashi K, Yagasaki K, Kohno M, Takenaka Y, Okuda E, Nakagawa S, Mikami B, Utsumi S. Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *Eur J Biochem* 2001; 268 (12): 3595-604

Mata E, Favier C, Moneret-Vautrin DA, Nicolas JP, Han Ching L, Gueant JL. Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein. *Allergy* 1994; 49(6): 442-7

Matsuo H, Dahlström J, Tanaka A, Kohno K, Takahashi H, Furumura M, Morita E.Sensitivity and specificity of recombinant omega-5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergy* 2008; 63(2):233-6

May CD, Alberto R. In-vitro responses of leucocytes to food proteins in allergic and normal children: lymphocyte stimulation and histamine release. *Clin Allergy*. 1972; 2(4): 335-44.

Maynard F, Jost R, Wal JM. Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine α-lactalbumin. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 478-88.

Mc Kenzie H, Main J, Pennington CR, Parratt D. Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and Candida albicans in Crohn's disease. *Gut* 1990; 31(5): 536-8

Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Verstege A, Wahn U, Beyer K, Niggemann B. The atopy patch test in the diagnostic workup of suspected food-related symptoms in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(4): 923-9

Meltzer EO. Evaluating rhinitis: clinical, rhinomanometric, and cytologic assessments. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82(5 Pt 2): 900-8

Mena M, Sanchez-Monge R, Gomez L, Salcedo G. Carbonero P. A major barley allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene. *Plant Mol Biol* 1992; 20: 451-8

Menendez-Arias L, Moneo I, Dominguez J, Rodriguez R. Primary structure of the major allergen of yellow mustard (Sinapis alba L.) seed, Sin a I. *Eur J Biochem* 1988; 177: 159-66.

Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996; 36(suppl): S165-86.

Mikkola JH, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:1005-12

Miller JB. Hidden food ingredients, chemical food additives and incomplete food labels.
Ann Allergy 1978; 41(2): 93-8

Mills ENC, Madsen C, Shewry PR, Wichers H. Food allergens of plant origin—their molecular and evolutionary relationships. *Trends Food Sci Technol* 2003; 14:145-56

Mine Y, Zhang JW. Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 1070-4
Mine Y, Rupa P. Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Eng.* 2003; 16(10): 747-52
Mittag D, Vieths S, Vogel L, Becker WM, Rihs HP, Helbling A Wuthrich B, Ballmer-Weber BK. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens, *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 148-54.
Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, Koppelman SJ, Knulst AC, Helbling A, Hefle SL, Van Ree R, Vieths S. *Ara h 8*, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6):1410-7

Mittag D, Batori V, Neudecker P, Wiche R, Friis EP, Ballmer-Weber BK, Vieths S, Roggen EL. A novel approach for investigation of specific and cross- reactive IgE epitopes on Bet v 1 and homologous food allergens in individual patients. *Mol Immunol*. 2006; 43(3): 268-78

Miyazawa H, Fukamachi H, Inagaki Y, Reese G, Daul CB, Lehrer SB, Inouye S, Sakaguchi M. Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 948-953

Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, Otzen DE. The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J Biol Chem* 2002; 277: 23684-92

Moneret-Vautrin DA, Hatahet R, Kanny G, Ait-Djafer Z. Allergenic peanut oil in milk formulas. *Lancet* 1991; 338(8775): 1149

Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Faller JP, Levan D, Kohler C.Choc anaphylactique grave avec arrêt cardiaque au café et à la gomme arabique, potentialisé par un collyre bêta-bloquant. *Rev Med Interne.* 1993; 14(2): 107-11

Moneret-Vautrin DA, Kanny G. [Food-induced anaphylaxis. A new French multicenter study]. *Bull Acad Natl Med* 1995. 179 (1): 161-72, 178-84; discussion 173-7

Moneret-Vautrin DA, Rance F, Kanny G, Olsewski A, Gueant JL, Dutau G, Guerin L. Food allergy to peanuts in France--evaluation of 142 observations. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28(9): 1113-9

Moneret-Vautrin D.A., Sainte-Laudy J., Kanny G, Frémont S. Human basophil activation measured by CD 63 expression and LTC4 release in food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 82: 33-40

Moneret-Vautrin DA, Guerin L, Kanny G, Flabbee J, Fremont S, Morisset M. Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 883-8

Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Beaudouin E, Morisset M. Diagnostic de l'allergie alimentaire : les tests de provocation orale standardisés en double aveugle. Revue de la Littérature et Expérience du Service de Médecine Interne, Immunologie Clinique et Allergologie de Nancy. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2000; 40: 237-50

Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Kanny G, Kirch F, Parisot L. Unusual soy oil allergy. *Allergy* 2002; 57: 266-7

Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G. Ulcerative colitis possibly due to hypersensitivity to wheat and egg. *Allergy* 2001; 56(5): 458-9.

Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Morisset M, Rance F, Fardeau MF, Beaudouin E. Severe food anaphylaxis: 107 cases registered in 2002 by the Allergy Vigilance Network. *Allerg Immunol* 2004; 36(2):46-51

Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Flabbee J, Beaudouin E, Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005; 60(4): 443-51

Moneret-Vautrin DA, Morisset M. Adult Food Allergy. *Curr Allergy Asthma Resp*. 2005; 5(1): 80-5

Moneret-Vautrin DA-Les plantes transgéniques (OGM végétaux) : connaissances et inconnues sur les risques d'allergénicité… *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006; 46(2): 85-91

Moneret-Vautrin DA. Concept d'allergovigilance: l'activité du Réseau d'Allergovigilance. *Revue de Médecine Interne* 2006 ; 27 Suppl 2: S70-2

Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodriguez R. Characterization of a new oriental-mustard (Brassica juncea) allergen, *Bra j* IE: detection of an allergenic epitope. *Biochem J* 1993; 293(suppl): 625-32

Moore LM, Rathkopf MM, Sanner CJ, Whisman BA, Demain JG. Seal and whale meat: two newly recognized food allergies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007; 98(1): 92-6

Morisset M, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxie alimentaire induite par l'aspirine. *Allergie Immunol*. 2001; 33(3): 147-9

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Maadi F, Fremont S, Guenard L, Croizier A, Kanny G. Prospective study of mustard allergy: first study with double-blind placebo-controlled food challenge trials (24 cases). *Allergy* 2003; 58(4): 295-9

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guénard L, Beaudouin E, Flabbée J, Hatahet R. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33(8): 1046-51

Morisset M, Boulègue M, Beaudouin E, Pirson F, Rancé F, Gallen C, Moneret-Vautrin DA. Anaphylaxie alimentaire sévère et léthale : cas rapportés en 2002 par le réseau d'allergovigilance. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003; 43(8): 480-5

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G; Allergo-Vigilance Network. Prevalence of peanut sensitization in a population of 4,737 subjects--an Allergo-Vigilance Network enquiry carried out in 2002. *Allerg Immunol*. 2005; 37(2): 54-7

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, Cuny JM, Frentz P, Hatahet R, Hanss Ch, Beaudouin E, Petit N, Kanny G. Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Allerg Immunol*. 2007; 39(1):12-9.

Morita E, Kameyoshi Y, Mihara S, Hiragun T, Yamamoto S. γ-gliadin: a presumptive allergen causing wheat-dependent exercise- induced anaphylaxis. *Br J Dermatol* 2001; 145(1): 182-4.

Moroz LA, Yang WH. Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *N Engl J Med* 1980; 302:1126-8

Mortuaire G, Marchetti P, Formstecher P, Danzé MP. Nouvelle approche globale en protéomique : les biopuces à protéines. Techniques actuelles et applications. *Annales de Biologie Clinique* 2004 ; 62 (2): 139-48.

Motoyama K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(12): 1997-2002.

Munoz-Furlong A. Living with food allergies: not as easy as you might think. *FDA Consum* 2001. 35 (4): 40.

Murphy DJ, Keen JN, O'Sullivan JN, Au DM, Edwards EW, Jackson PJ, et al. A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins.*Biochim Biophys Acta* 1991; 1088: 86-94

Mykles DL, Cotton JL, Taniguchi H, Sano K, Maeda Y. Cloning of tropomyosins from lobster (*Homarus americanus*) striated muscles, fast and slow isoforms may be generated from the same transcript. *J Muscle Res Cell Motil* 1998; 19: 105-115

Nagata S, Yamashiro Y, Ohtsuka Y, Shioya T, Oguchi S, Shimizu T, Maeda M. Quantitative analysis and immunohistochemical studies on small intestinal mucosa of food-sensitive enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995; 20(1): 44-8

Nakagawa T, Stadler BM, de Weck AL. Flow-cytometric analysis of human basophil degranulation. I. Quantification of human basophils and their degranulation by flow-cytometry. *Allergy* 1981; 36(1): 39-47

Nakase M, Usui Y, Alvarez-Nakase AM, Adachi T, Urisu A, Nakamura R, Aoki N, Kitajima K, Matsuda T. Cereal allergens: rice-seed allergens with structural similarity to wheat and barley allergens. *Allergy* 1998; 53:55-7

Nguyen SA, More DR, Whisman BA, Hagan LL. Cross-reactivity between coconut and hazelnut proteins in a patient with coconut anaphylaxis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92(2): 281-4

Niemeijer NR, de Monchy JG, Meijer GH, van Hove W, Dijkstra TJ, Kauffman HF, Poulsen LK, Blindslev-Jensen C, Løwenstein H.Optimization, Standardization and control of food allergens. *In :* B Wiïthrich,C Ortolani. *Highlights in food allergy. Monogr Allergy*. Basel, Karger, 1996 : 50-56

Niggemann B et al. Evaluation of the clinical relevance of sensitization to food in children with atopic dermatitis. Results of 387 DBPCFC's. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 101, n°1, part 2, abst 371.

Niggemann B, Reibel S, Wahn U. The atopy patch test (APT)--a useful tool for the diagnosis of food allergy in children with atopic dermatitis. *Allergy* 2000 55(3): 281-5.

Niggemann, B, Reibel S, Roehr CC, Felger D, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U. Predictors of positive food challenge outcome in non-IgE-mediated reactions to food in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(6): 1053-8

Niggemann B, Binder C, Dupont C, Hadji S, Arvola T, Isolauri E. Prospective, controlled, multi-center study on the effect of an amino-acid-based formula in infants with cow's milk allergy/intolerance and atopic dermatitis. *Pediatr Allerg Immunol* 2001; 12: 78-82

Niggemann B, Ziegert M, Reibel S. Importance of chamber size for the outcome of atopy patch testing in children with atopic dermatitis and food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(3): 515-6.

Niggemann B, Rolinck-Werninghaus C, Mehl A, Binder C, Ziegert M, Beyer K. Controlled oral food challenges in children - when indicated, when superfluous? *Allergy* 2005; 60(7): 865-70.

Nilson C, Oman H, Hallden G, Lilja G, Lundberg M, Harfast B. A case of allergy to cow's milk hydrolysate. *Allergy* 1999; 54(12): 1322-6

Nitta K, Sugai S. The evolution of lysozyme and α -lactalbumin. *Eur J Biochem* 1989; 182: 111-8.

Noguchi E, Shibasaki M, Nishiyama C, Okumura Y, Takita H. IgE responsiveness to *Dermatophagoides farinae* in young asthmatic children: IgE binding study using recombinant allergens of Der f 1, Der f 2 and mutant proteins of Der f 2. *Int. Arch. Allergy Immunol* 1996; *110:* 380-7

Noon L. Prophylactic inoculation against hay-fever. *Lancet* 1911;1: 1572-3

Nordlee JA, Taylor SL, Jones RT, Yunginger JW. Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J Allergy Clin Immunol.* 1981; 68(5): 376-82

Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med* 1996; 334(11): 688-92

Nowak-Wegrzyn A, Shapiro GG, Beyer K, bardina L, Sampson HA. Contamination of dry powder inhalers for asthma with milk proteins containing lactose. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(3): 558-60

Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K, Sasaoka K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) 1991; 37: 555-65.

Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Nishikawa K, Kitamura K. Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59:831-3

Ogawa, A., Samoto M, Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2000; 46:271-279

Ohnuma S, Higa M Hamanaka S, Matsushima K, Yamamuro W. An outbreak of allergy-like food poisoning. *Intern Med* 2001; 40(8): 833-5.

Oppenheimer JJ, Bock SA. The ice cream parlor challenge could be a killer. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(2): 325-6

Ortega HG, Kreiss K, Schill DP, Weissman DN. Fatal asthma from powdering shark cartilage and review of fatal occupational asthma literature. *Am J Ind Med*. 2002; 42(1): 50-4

Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. J *Allergy Clin Immunol.* 1989; 83(3):683-90

Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Hansen KS, Ispano M, Wuthrich B, Bindslev-Jensen C, Ansaloni R, Vannucci L, Pravettoni V, Scibilia J, Poulsen LK, Pastorello EA. Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105(3):577-81

Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(1): 144-5.

Pajno GB, Passalacqua G, Salpietro C, Vita D, Caminiti L, Barbiero G. Looking for immunotolerance: a case of allergy to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Allerg Immunol*. 2005; 37(7): 271-2

Palm M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Denery-Papini S, Fremont S. Food allergy to egg and soy lecithins. *Allergy* 1999; 54(10): 1116-7

Palmer GW, Dibbern DA Jr, Burks AW, Bannon GA, Bock SA, Porterfield HS, McDermott RA, Dreskin SC. Comparative potency of *Ara h* 1 and *Ara h* 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clin Immunol.* 2005; 115(3): 302-12

Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T. Wheat omega -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 634-8

Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Kalkkinen N, Reunala T. Rye gamma-70 and gamma-35 secalins and barley gamma-3 hordein crossreact with omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 466-73

Pan W, Zhang T, Takebe m, Sampson H. Comparison of Efficacy of a Novel Probiotic from Koji Fermentation (***ImmuSoy***) with LGG on Peanut Allergy. *J allergy Immunol* 2006; 117(2)-supl 1: S327

Paschke A, Zunker K, Wigotzki M, Steinhart H. Determination of the IgE-binding activity of soy lecithin and refined and non refined soybean oils. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756(1-2):249-54

Pascual C, Martin Esteban M, Crespo JF. Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr.* 1992;121(5 Pt 2): S29-34

Pasteur Louis. *Études sur la bière et les conseils aux brasseurs*. 1875

Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida MG, Ortolani C. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 531-7

Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A. The major allergen of peach (Prunus persica) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: (3Pt1): 520-6

Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Ispano M, Fortunato D, Monza M, Giuffrida MG, Rivolta F, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A, Ortolani C. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1099-106

Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M, Ansaloni R, Fortunato D, Scibola E, Rivolta F, Incorvaia C, Bengtsson A, Conti A, Ortolani C. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 371-7

Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(4): 775-83.

Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Brenna O, Farioli L, Trambaioli C, Conti A. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy* 2001; 56 (suppl 67): 45-7

Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, Trambaioli C, Scibola E, Calamari AM, Robino AM, Conti A. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756 (1-2): 95-103

Pastorello EA, Varin E, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Trambaioli C, Fortunato D, Giuffrida MG, Rivolta F, Robino A, Calamari AM, Lacava L, Conti A. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756 (1-2): 85-93

Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Luttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wutrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C, Conti A. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109(3):563-70

Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Perono Garoffo L, Calamari AM, Brenna O, Conti A. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2): 350-9

Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Robino AM, Scibilia J, Fortunato D, Conti A, Borgonovo L, Bengtsson A, Ortolani C. Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4): 908-14.
Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De Pasquale T, Buonomo A, Gasbarrini G, Di Campli C, Schiavino D. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17(3): 459-65

Pauli G. Intérêt diagnostic des allergènes recombinants. *Rev Fr Allergol*. 1997, 37 (8): 1093-101

Peltre G. Les allergènes recombinants des pollens de graminées. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 1995; 35(3) : 283-5

Peng GC, Hsu CH. The efficacy and safety of heat-killed *Lactobacillus paracasei* for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16(5): 433-8

Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1):144-9.

Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, Sastre J, Bernal ML, Rodríguez J, Bedate CA.Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of Anisakis simplex. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000; 123(2): 120-9

Piatt JD. Case report: Urticaria following intentional ingestion of cicadas. *Am Fam Physician*. 2005; 71(11): 2048-50.

Plebani A, Restani P, Naselli A, Galli CL, Meini A, Cavagni G, Ugazio AG, Poiesi C Monoclonal and polyclonal antibodies against casein components of cow milk for evaluation of residual antigenic activity in 'hypoallergenic' infant formulas. *Clin Exp Allergy.* 1997; 27(8): 949-56

Pohjavuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, Savilahti E. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1): 131-6

Poms RE, C. L. Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 2004; 21 (1): 1-31

Pons L, Olszewski A, Gueant JL. Characterization of the oligomeric behavior of a 16.5 kDa peanut oleosin by chromatography and electrophoresis of the iodinated form. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 706(1): 131-40

Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC, Guéant JL. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy* 2002; 57(suppl 72): 88-93

Porcel S, Leon F, Cumplido J, Cuevas M, Guimaraens D, Conde-Salazar L. Contact urticaria caused by heat-sensitive raw fish allergens. *Contact Dermatitis.* 2001; 45(3): 139-42

Porras O, Carlsson B, Fallström SP, Hanson LA: Detection of proteins in soy lecithin, margarine and occasionally soy oil. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 78: 30-2

Prautnitz C, Küstner H. Studien über die Uberempfindlichkeit. *Centralbl Bakteriol Abt Orig* 1921; 86:160-9

Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB Loh R, Sly PD, Holt PG. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 1998; 160(10):4730-7

Prescott SL, Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(12): 1557-64.

Quince S, Maranoni F, Umpierrez A, de las Heras M, Fernandez-Caldas E, Sastre J. Chicken serum albumin (*Gal d 5**) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy* 2001; 56(8): 754-62

Raap U, Schaefer T, Kapp A, Wedi B. Exotic food allergy: anaphylactic reaction to lychee. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2007; 17(3): 199-201

Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h3. *J Clin Invest* 1999; 103 (4): 535-42

Ramachandran S, Christensen HE, Ishimaru Y, Dong CH, Chao-Ming W, Cleary AL, Chua NH. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2000; 124 (4): 1637-47

Rancé F, Dutau G. Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8: 41-4

Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlation between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE, and food challenges. *Allergy* 1997; 52: 1031-5

Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10: 33-8

Rance F, Dutau G. Peanut hypersensitivity in children. Pediatr Pulmonol Suppl 1999; 18:165-7

Rancé F, Abbal M, Lauwers-Cances V. Improved screening for peanut allergy by the combined use of skin prick tests and specific IgE assays. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 1027-33.

Rancé F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy* 2003; 58(4): 287-8.

Rancé F, Bidat E, Bourrier T, Sabouraud D. Cashew allergy: observations of 42 children without associated peanut allergy. *Allergy* 2003; 58: 1311-6

Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H. Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(2): 167-72

Rasanen L, Lehto M, Turjanmaa K, Savolainen J, Reunala T. Allergy to ingested cereals in atopic children. *Allergy* 1994; 49(10): 871-6.

Rawlings ND, Barrett AJ. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 1994; 244: 461-86

Ree-Kim L, Lehrer SB. Seafood allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004; 4(3): 231-4.

Reese G, Schicktanz S, Lauer I, Randow S, Luttkopf D, Vogel L, Lehrer SB, Vieths S. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, Penaeus aztecus. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(4): 517-24

Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, Wangorsch A, Haustein D, Vieths S. IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:105-14

Renaud C, Cardiet C, Dupont C. Allergy to soy lecithin in a Child. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 22(3): 328-9.

Reuter A, Lidholm J, Ostling J, Scheurer S, Enrique E, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncin M, Ballmer-Weber BK, Vieths S. A critical assessment of allergen component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 815-2

Ribadeau-Dumas B. Structure and variability of milk proteins. In: Barth CA, Schlimme E, editors. *Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects*. Darmstadt, Germany: Steinkopff; 1989: 112-3

Rihs HP, Chen Z, Rueff F, Petersen A, Rozynek P, Heimann H, Baur X. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1293-301.

Rizzello CG, De Angelis M, Coda R, Gobbetti M. Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy*Eur Food Res Technol* 2006; 223: 405-11

Roberts G, Golder N, Lack G. Bronchial challenges with aerosolized food in asthmatic, food-allergic children. *Allergy* 2002; 57(8): 713-7

Robotham JM, Wang F, Seamon V, Teuber SS, Sathe SK, Sampson HA, Beyer K, Seavy M, Roux KH. Ana o 3, an important cashew nut (Anacardium occidentale L.) allergen of the 2S albumin family. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(6): 1284-90

Rodrigo MJ, Morell F, Helm RM, Swanson M, Greife A, Anto JM, Sunyer J, Reed CE. Identification and partial characterization of the soybean-dust allergen involved in the Barcelona asthma epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 778-84

Rodriguez V, Bartolomé B, Armisén M, Vidal C. Food allergy to Paracentrotus lividus (sea urchin roe). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007; 98(4): 393-6

Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M, Gomez-Aguado F, Rodriguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML, Moneo I. Cloning and characterisation of the Anisakis simplex allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol.* 2007; 37(8-9): 907-17

Rodriguez-Perez R, Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Salcedo G. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2. *Allergy* 2003; 58: 635-40

Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, Ehlers I, Worm M, Zuberbier T, Niggemann B. Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1534-41

Roger A, Rubira N, Nogueiras C, Guspi R, Baltasar M, Cadahia A. Anaphylaxis caused by royal jelly. *Allergol Immunopathol* 1995; 23: 133-5

Rosmilah M, Shahnaz M, Masita A, Noormalin A, Jamaludin M. Identification of major allergens of two species of local snappers: Lutjanus argentimaculatus (merah/ red snapper) and Lutjanus johnii (jenahak/ golden snapper). *Trop Biomed* 2005; 22(2): 171-7

Roux KH, Teuber SS, Robotham JM, Sathe SK. Detection and stability of the major almond allergen in foods.*J Agric Food Chem*. 2001; 49(5): 2131-6

Roux KH, Teuber SS, Sathe SK. Tree nut allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131(4): 234-44

Rozenfeld P, Docena GH, Anon MC, Fossati CA. Detection and identification of a soy bean component that cross reacts with caseins from cow’s milk. *Clin Exp Immunol*. 2002;130: 49-58.

Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 2004; 145(5):612-6

Ruiter B, Trégoat V, M'rabet L, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, Hoffen E. Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36(3): 303-10

Rupa P, Mine Y. Ablation of ovomucoid-induced allergic response by desensitization with recombinant ovomucoid third domain in a murine model. *Clin Exp Immunol*. 2006; 145(3): 493-501

Sabbah A, Lauret MG, Chene J, Boutet S, Drouet M. Le syndrome porc-chat ou l’allergie croisée entre viande de porc et épithelia de chat (2). *Allerg Immunol* 1994; 26(5):173-4, 177-80.

Saito Y, Sasaki F Tanaka I, Sato M, Okazawa M, Sakakibara H, Suetsugu S. Acute severe alcohol-induced bronchial asthma. *Intern Med* 2001; 40(7): 643-5.

Sakaguchi H, Inoue R, Kaneko H, Watanabe M, Suzuki K, Kato Z, Matsushita S, Kondo N. Interaction among human leucocyte antigen-peptide-T cell receptor complexes in cow’s milk allergy: the significance of human leucocyte antigen and T cell receptor-complementarity determining region 3 loops. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:762-70

Sakaguchi M, Toda M, Ebihara T, Irie S, Hori H, Imai A, Yanagida M, Miyazawa H, Ohsuna H, Ikezawa Z, Inouye S. IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 579-84

Salcedo G, Diaz-Perales A, Sanchez-Monge R. The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1: 177-83

Samoto M, Akasaka T, Mori H, Manabe M, Ookura T, Kawamura Y. Simple and efficient procedure for removing the 34 kDa allergenic protein, Gly m I, from defatted soy milk. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58: 2123-5

Sampson HA, Jolie PL. Increased plasma histamine concentrations after food challenges in children with atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 1984; 311(6):372-6.

Sampson HA, Broadbent KR, Bernhisel-Broadbent J. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N Engl J Med*. 1989; 321(4): 228-32.

Sampson HA, James JM, Bernhisel-Broadbent J. Safety of an amino acid-derived infant formula in children allergic to cow milk. *Pediatrics* 1992; 90(3): 463-5

Sampson HA, Bernhisel-Broadbent J,Yang E, Scanlon SM. Safety of casein hydrolysate formula in children with cow milk allergy. *J Pediatr* 1991; 118: 520-5

Sampson HA. The immunopathogenic role of food hypersensitivity in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 1992; 176: 34-7
Sampson H, Mendelson L, Rosen J. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327: 380-4.
Sampson H. Epidemiology of food allergy, *Pediatr Allergy Immunol* 1996; 7: 42-50.
Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin. Immunol.*1999; 103:717-28

Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 891-6.

Sampson HA. Anaphylaxis and emergency treatment. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 3): 1601-8

Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin.Immunol* 2004; 113: 805-19

Sanchez C, Frémont S. Consequences of heat treatment and processing of food on the structure and allergenicity of component proteins, *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003, 43**:** 13-20

Sanchez-Monge R, Gomez L, Barber D, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G. Wheat and barley allergens associated with baker's asthma.Glycosylated subunits of the alpha-amylase-inhibitor family have enhanced IgE-binding capacity. *Biochem J* 1992; 281: 401-5

Sanchez-Monge R, Blanco C, Diaz-Perales A, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C, et al. Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 673-80

Sanchez-Monge R, Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 514-9

Sanchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, Fernandez-Crespo J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 955-61

Sánchez-Monge R, Blanco C, Perales AD, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106(1 Pt 1):190-5

Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Pascual CY, Varela J, Martin-Esteban M, Salcedo G. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(11): 1747-53.

Sanchez-Monge R, Blanco C, Lopez-Torrejon G, Cumplido J, Recas M, Figueroa J, Carrillo T, Salcedo G. Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118(3):705-10

Sander I, Flagge A, Merget R, Halder TM, Meyer HE, Baur X.Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107(5): 907-13

San Miguel-Moncin M, Krail M, Scheurer S, Enrique E, Alonso R, Conti A, Cistero-Bahima A, Vieths S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy* 2003; 58 (6): 511-7

Santos ABR, Tobias KR, Ferriani VPL, Rizzo MC, Naspitz CK, Pomes A, Vailes LD, Chapman MC, Arruda LK Identification of tropomyosin from *Periplaneta americana* as a major cockroach allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: S122

Schäfer T, Böhler S, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, Filipiak B, Wichmann H-E, Ring J: Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* 2001; 56: 1172-9.

Scheibe B, Weiss W, et al. Detection of trace amounts of hidden allergens: hazelnut and almond proteins in chocolate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756(1-2): 229-37.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270 (5235): 467-70

Scheurer S, Son DY, Boehm M, Karamloo F, Franke S, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Cross-reactivity and epitope analysis of *Pru a* 1, the major cherry allergen, *Mol Immunol* 1999; 36: 155-67.

Scheurer S, Wangorsch A, Haustein D, Vieths S. Cloning of the minor allergen *Api g 4* profilin from celery (Apium graveolens) and its crossreactivity with birch pollen profilin *Bet v 2*. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 962-71

Scheurer S, Pastorello EA, Wangorsch A, Kastner M, Haustein D, Vieths S. Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 724-31

Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wuthrich B, Haustein D, Vieths S.Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (*Api g 4*) with birch pollen profilin Bet v 2. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756 (1-2): 315-25

Scheynius A, Johansson C, Buentke E, Zargari A, Linder MT. Atopic eczema/dermatitis syndrome and *Malassezia*. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(3): 161-9

Schuller A, Morisset M, Maadi F, Kolopp Sarda MN, Fremont S, Parisot L, Kanny G, Moneret -Vautrin DA. Occupational asthma due to allergy to spinach powder in a pasta factory. *Allergy* 2005; 60(3): 408

Schwartz HR, Nerurkar LS, Spies JR, Scanlon RT, Bellanti JA. Milk hypersensitivity: RAST studies using new antigens generated by pepsin hydrolysis of beta-lactoglobulin. *Ann Allergy* 1980; 45(4): 242-5

Seppala U, Alenius H, Turjanmaa K, Reunala T, Palosuo T, Kalkkinen N. Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:165-71

Seppala U, Majamaa H, Turjanmaa K, Helin J, Reunala T, Kalkkinen N, Palosuo T. Identification of four novel potato (Solanum tuberosum) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors. *Allergy* 2001; 56 (7): 619-26.

Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297(5590): 2275-9.

Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Sabba-Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *J Immunol* 1993; 151: 5354-63

Sharma S, Kumar P, Betzel C, Singh TP. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 756(1-2): 183-7

Shefcheck KJ, Callahan JH, Musser SM. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem.* 2006; 54(21): 7953-9

Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 2005; 60(7): 912-9

Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 1995; 7: 945-56

Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 906-10.

Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 1995; 3: 189-99

Shin DS, Compadre CM, Maleki SJ, Kopper RA, Sampson H, Huang SK, Burks AW, Bannon GA. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on *Ara h 1*, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem* 1998; 273 (22): 13753-9

Shinbara M, Kondo N, Agata H, Fukutomi O, Kuwabara N, Kobayashi Y, Miura M, Orii T. Interferon-gamma and interleukin-4 production of ovalbumin-stimulated lymphocytes in egg-sensitive children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77: 60-6

Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(4): 776-82

Shreffler WG, Lencer DA, Bardina L, Sampson HA. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116(4): 893-9

Sicherer SH, Eigenmann PA, Sampson HA Clinical features of food protein-induced enterocolitis syndrome. *J Pediatr*. 1998; 133(2): 214-9.

Sicherer SH, Burks WA, Sampson HA. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics* 1998; 102: e6.
Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 559-62.
Sicherer SH, Sampson HA. Peanut and tree nut allergy. *Curr Opin Pediatr* 2000; 12(6): 567-73.

Sicherer SH, Morrow EH, Sampson HA. Dose-response in double-blind, placebo-controlled oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105(3):582-6

Sicherer SH, Furlong TJ, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 128-32.

Sicherer SH, Noone SA, Koerner CB, Christie L, Burks AW, Sampson HA. Hypoallergenicity and efficacy of an amino acid-based formula in children with cow's milk and multiple food hypersensitivities. *J Pediatr.* 2001; 138(5): 688-93

Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(6): 1203-7.

Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 159-65

Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117 (2) suppl. 2: S470-5

Simonato B, De Lazzari F, Pasini G, Polato F, Giannattasio M, Gemignani C, Peruffo AD, Santucci B, Plebani M, Curioni A. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(11): 1771-8.

Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Peruffo AD, De Lazzari F, Curioni A. Food Allergy to Wheat Products: The Effect of Bread Baking and in Vitro Digestion on Wheat Allergenic Proteins. A Study with Bread Dough, Crumb, and Crust. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(11): 5668-73

Skamstrup Hansen K, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Sparholt SH, Nordskov Hansen G, Niemeijer NR, Malling HJ, Poulsen LK. Standardization of food allergen extracts for skin prick test. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 756(1-2): 57-69.

Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB, Sampson HA, Burks W, Wood RA. 2001. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:367-74.

Smillie LB. Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. *Trends Biochem Sci* 1979; 4: 151-5

Smits HH, Engering A, vander Kleij D, de jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(6): 1260-7

Solensky R. Resolution of fish allergy: a case report. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 91(4): 411-2

Sowka S, Hsieh LS, Krebitz M, Akasawa A, Martin BM, Starrett D, et al. Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast Pichia pastoris. *J Biol Chem* 1998; 273: 28091-7

Speer F. Multiple food allergy. *Ann Allergy* 1975; 34(2): 71-6.

Spergel JM, Beausoleil JL, Pawlowski N. Resolution of childhood peanut allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85:473-6.

Spergel JM, Beausoleil JL, Mascarenhas M, Liacouras CA. The use of skin prick-tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(2): 363-8

Spergel JM. Eosinophilic esophagitis in adults and children: evidence for a food allergy component in many patients.*Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007; 7(3):274-8

Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1540-6

Spuergin P, Mueller H, Wa1ter M, Schiltz E, Forster J. Allergenic epitopes of bovine α-sl-casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy* 1996; 51: 306-12.
Stanley JS, King N, Burks AW *et al*. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h2. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 244-53.
Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol* 1982; 15(2): 189-203

Sten E, Stahl Skov P, Andersen SB, Torp AM, Olesen A, Bindslev-Jensen U, Poulsen LK, Bindslev-Jensen C. Allergenic components of a novel food, Micronesian nut Nangai (Canarium indicum), shows IgE cross-reactivity in pollen allergic patients. *Allergy* 2002; 57(5):398-404

Steensma DP. The kiss of death: a severe allergic reaction to a shellfish induced by a good-night kiss. *Mayo Clinic Proc* 2003; 78 (2):221-2

Steinman HA. "Hidden" allergens in foods. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(2): 241-50

Stephan O, Vieths S Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (Arachis hypogaea) in processed foods. J Agric Food Chem. 2004; 52(12): 3754-60

Stevens DA, Calderon L, Martinez M, Clemons KV, Wilson SJ, Selitrennikoff CP. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a Candida vaginitis model. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 361-4

Suhr M, Wicklein D, Lepp U, Becker WM. Isolation and characterization of natural *Ara h 6*: evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol Nutr Food Res*. 2004; 48(5): 390-9.

Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Verdino P, Keller W, Sperr WR, Valent P, Valenta R, Spitzauer S. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J Immunol*. 2002; 168(9): 4576-84.

Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, Sperr WR, Valent P, Peltre G, Quirce S, Douladiris N, Papadopoulos NG, Valenta R, Spitzauer S. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J Immunol.* 2007; 178(10): 6290-6

Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(Suppl 2): S17-25.
Szepfalusi Z, Ebner C, Pandjaitan R, Orlicek F, Scheiner O, Boltz-Nitulescu G, Kraft D, Ebner H. Egg yolk alpha-livetin (chicken serum albumin) is a cross-reactive allergen in the bird-egg syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 93(5): 932-42
Tariq SM, Stevens M, Matthews S, Ridout S, Twiselton R, Hide DW. Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. *Br Med J* 1996; 313:514-7.
Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101(5):587-93.

Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Arshad SH. Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age. *Pediatr Allergy Immunol*. 2000;11(3):162-7

Tay SS, Clark AT, Deighton J, King Y, Ewan PW. T cell proliferation and cytokine responses to ovalbumin and ovomucoid detected in children with and without egg allergy. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37(10): 1519-27

Taylor S. Chemistry and detection of food allergens. Food Technology 1992; 46, 148-52

Taylor SL, Lehrer SB. Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1996; 36 Suppl: S91-118.

Taylor SL, Hefle SL. Hidden triggers of adverse reactions to foods. *Can J Allergy Clin Immunol* 2000; 5: 106-10

Taylor SL, Hefle SL: Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology* 2001; 55: 68-83.

Taylor SL. Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 99-112

Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Bock SA, Burks AW Jr, Christie L, Hill DJ, Host A, Hourihane JO, Lack G, Metcalfe DD, Moneret-Vautrin DA, Vadas PA, Rance F, Skrypec DJ, Trautman TA, Yman IM, Zeiger RS. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? Journal *of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 109, 24-30

Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Atkins FM, Andre C, Bruijnzeel-Koomen C, Burks AW, Bush RK, Ebisawa M, Eigenmann PA, Host A, Hourihane JO, Isolauri E, Hill DJ, Knulst A, Lack G, Sampson HA, Moneret-Vautrin DA, Rance F, Vadas PA, Yunginger JW, Zeiger RS, Salminen JW, Madsen C, Abbott P. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 689-95

Taylor SL, Lambrecht DM, Hefle SL. Tagatose and milk allergy. *Allergy* 2005; 60 (3) : 412-3

Teuber SS, Dandekar AM, Peterson WR, Sellers CL. Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (Juglans regia), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101(6 Pt 1):807-14.

Teuber SS, Jarvis KC, Dandekar AM, Peterson WR, Ansari AA. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilinlike proprotein, *jug r 2*, from English walnut kernel (Juglans regia), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1311-20

Teuber SS, Peterson WR. Systemic allergic reaction to coconut (Cocos nucifera) in 2 subjects with hypersensitivity to tree nut and demonstration of cross-reactivity to legumin-like seed storage proteins: new coconut and walnut food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1180-5

Teuber SS, Peterson WR, Uratsu S *et al*. Identification and cloning of Jug r 4, a major food allergen from English walnut belonging to the legumin group (Abstract 720). *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S248.

Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(5): 932-9

Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Raki M, Kwok WW, Jung G, Lundin KE, Sollid LM. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest*. 2006; 116(8):2226-36

Tsuji H, Bando N, Heimori M, Yamanishi R, Kimoto M, Nishikawa K, Ogawa T. Purification of characterization of soybean allergen *Gly m* Bd 28K. *Biosci Biotech Biochem* 1997; 61: 942-7.

Tsuji H, Okada N, Yamanishi R, Bando N, Kimoto M, Ogawa T. Measurement of Gly m Bd 30K, a major soybean allergen, in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995; 59(1): 150-1

Untersmayr E, Focke M, Kinaciyan T, Poulsen LK, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Anaphylaxis to Russian Beluga caviar. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109(6):1034-5

Untersmayr E, Scholl I, Swoboda I, Beil WJ, Forster-Waldl E, Walter F, Riemer A, Kraml G, Kinaciyan T, Spitzauer S, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (3): 616-23

Untersmayr E, Poulsen LK, Platzer MH, Pedersen MH, Boltz-Nitulescu G, Skov PS, Jensen-Jarolim E. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(2):377-82.

Untersmayr E, Bakos N, Scholl I, Kundi M, Roth-Walter F, Szalai K, Riemer AB, Ankersmit HJ, Scheiner O, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. Anti-ulcer drugs promote IgE formation toward dietary antigens in adult patients. *FASEB J.* 2005; 19(6): 656-8.

Untersmayr E, Szalai K, Riemer AB, Hemmer W, Swoboda I, Hantusch B, Scholl I, Spitzauer S, Scheiner O, Jarisch R, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Mol Immunol* 2006; 43(9):1454-61

Untersmayr E, Vestergaard H, Malling HJ, Jensen LB, Platzer MH, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Skov PS, Jensen-Jarolim E, Poulsen LK. Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jan 8; [Epub ahead of print]

Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 896-904

Valinas B, Lorenzo S, Eiras A, Figueiras A, Sanmartin ML, Ubeira FM. Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to Anisakis simplex in a Spanish population. *Allergy* 2001; 56(7): 667-71

Vanderhoof JA, Murray ND, Kaufman SS, Mack DR, Antonson DL, Corkins MR, Perry D, Kruger R. Intolerance to protein hydrolysate infant formulas: an underrecognized cause of gastrointestinal symptoms in infants. *J Pediatr* 1997; 131(5): 741-4

van der Velden VH, Laan MP, Baert MR, de Waal Malefyt R, Neijens HJ, Savelkoul HF Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31(7): 997-1006

Van Do T, Hordvik I, Endresen C, Elsayed S. The major allergen (parvalbumin) of codfish is encoded by at least two isotypic genes: cDNA cloning, expression and antibody binding of the recombinant allergens. *Mol Immunol*. 2003; 39(10): 595-602.

Van Do T, Hordvik I, Endresen C, Elsayed S. Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M. *Mol Immunol*. 2005; 42(3): 345-53

Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(6):1314-20.

Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D Scheiner O, Breiteneder H. Cloning and sequencing of *Mal d 1*, the major allergen from apple *(Malus*

domestica), and its immunological relationship to *Bet v 1*, the major birch pollen allergen, *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 214 (2): 538-51.
van Hengel AJ, Capelletti C, Brohée M, Anklam E. Validation of two commercial lateral flow devices for the detection of peanut proteins in cookies: interlaboratory study. *J AOAC Int* 2006; 89: 462-8

van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 111-8

Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1-type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; 5: 85-97

Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002; 109: 678-84.
van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, , Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. *Allergy* 1996; 51 (2): 108-13
van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98: 97-104

van Ree R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 910-3

van Ree R, Dorpema JW, Vieths S. Allergy vaccines: a need for standardisation in mass units of major allergen. *Pharmeuropa Bio* 2005; 27-30

Varjonen E, Bjorksten F, Savolainen J. Stability of cereal allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26(4): 436-43

Vassilopoulou E, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Rigby NR, Mills EN, van Ree R, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG. Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 143(2): 92-102

Venter C, Pereira B, Grundy J, Clayton CB, Arshad SH, Dean T. Prevalence of sensitization reported and objectively assessed food hypersensitivity amongst six-year-old children: A population-based study. *Pediatric Allergy and Immunology* 2006; 17 (5): 356-63

Vervloet D, Senft M, Dugue P, Arnaud A, Charpin J. Anaphylactic reactions to modified fluid gelatins. *J Allergy Clin Immunol.* 1983; 71(6): 535-40

Vicente-Serrano J, Caballero ML, Rodríguez-Pérez R, Carretero P, Pérez R, Blanco JG, Juste S, Moneo ISensitization to serum albumins in children allergic to cow's milk and epithelia. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007; 18(6): 503-7

Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Muller U, Reindl J, Haustein D. Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy* 1998; 53 *(Suppl):* 65-71

Vierk K, Falci K, Wolyniak C, Klontz KC. Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109 (6): 1022-6.

Vierk KA, Koehler KM, Fein SB, Street DA. Prevalence of self-reported food allergy in American adults and use of food labels. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(6):1504-10.
Vierucci A, Novembre E, de Martino M, Lucci A, Dini L. Reliability of tests for specific IgE to foods in atopic dermatitis. *Allergy* 1989; 9 (suppl): 90-6

Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy* 1994; 49(4): 262-71

Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of crossreactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964: 47-68

Vila L, Sanz ML, Sánchez G, Uasuf CG, Ferrer M, Barrio M, Diéguez I. Study of the in vitro sulphidoleukotriene production in food-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2001; 11(4): 247-54

Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 2005; 60(4): 494-500

Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilathi E. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16(1): 65-71

Wal JM. Structure and function of milk allergens. Allergy. 2001; 56 Suppl 67:35-8

Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002; 89 (Suppl 1): 3-10

Wallowitz M, Peterson WR, Uratsu S, Comstock SS, Dandekar AM, Teuber SS. *Jug r* 4, a legumin group food allergen from walnut (Juglans regia Cv. Chandler). *J Agric Food Chem*. 2006; 54(21): 8369-75

Wallowitz ML, Chen RJ, Tzen JT, Teuber SS. Ses i 6, the sesame 11S globulin, can activate basophils and shows cross-reactivity with walnut in vitro. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(6): 929-38

Walsh BJ, Barnett D, Burley RW, Elliott C, Hill DJ, Howden MEH.. New allergens from hen's egg white and yolk In vitro study of ovomucin, apovitellenins I and VI and phosvitin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988; 87: 81-6.

Wagner S, Sowka S, Mayer C, Crameri R, Focke M, Kurup VP, Scheiner O, Breiteneder H. Identification of a Hevea brasiliensis latex manganese superoxide dismutase (*Hev b* 10) as a cross-reactive allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125(2):120-7

Walker-Smith J. An eye witness perspective of the changing patterns of food allergy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 17(12): 1313-6

Wallowitz ML, Chen RJ, Tzen JT, Teuber SS. Ses i 6, the sesame 11S globulin, can activate basophils and shows cross-reactivity with walnut in vitro. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(6): 929-38

Walsh BJ, Barnett D, Burley RW, Elliott C, Hill DJ, Howden ME. New allergens from hen's egg white and egg yolk. In vitro study of ovomucin, apovitellenin I and VI, and phosvitin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 87(1): 81-6

Wang F, Robotham JM, Teuber SS, Tawde P, Sathe SK, Roux KH. *Ana o 1*, a cashew (Anacardium occidental) allergen of the vicilin seed storage protein family. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 160-6

Wang F, Robotham JM, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. *Ana o 2*, a major cashew (Anacardium occidentale L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 132:27-39

Wang MF, Lin HC, Wang YY, Hsu CH. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15(2):152-8.

Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, Kawada T. Dietary fat and an exogenous emulsifier increase the gastrointestinal absorption of a major soybean allergen, *Gly m Bd* 30K, in mice. *J Nutr*. 2005; 135(7): 1738-44

Webb LM, Lieberman P. Anaphylaxis: a review of 601 cases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006; 97(1): 39-43

Weber D, Raymond P, Ben-Rejeb S, Lau B. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens. *J Agric Food Chem* 2006; 54(5): 1604-10

Weiss W, Vogelmeier C, Görg A. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis* 1993; 14: 805-16

Welt K, Hinrichs R, Ott S, Thalmann M, Dieckmännken J, Schneider LA, Staib G, Scharffetter-Kochanek K. Anaphylaxis after the ingestion of lamb meat. *Allergy*. 2005; 60(4): 545

Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, Stapel SO, Bruijnzeel-Koomen CA, Aalberse RC, Bast BJ, Knulst AC, van Ree R. IgE to *Bet v 1* and profilin: crossreactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110 (3): 435-42.

Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 915-20

Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, Akkerdaas JH, van Ree R, Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC. The range of minimum provoking doses in hazelnut-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(12): 1757-62

Werfel SJ, Cooke SK, Sampson HA. Clinical reactivity to beef in children allergic to cows milk. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 293-300.

Werner MT, Faeste CK, Egaas E Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in foods. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(20): 8025-32.

Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 2005; 90(9): 892-7

Westphal S, Kolarich D, Foetisch K, Lauer I, Altmann F, Conti A, Crespo JF, Rodriguez J, Enrique E, Vieths S, Scheurer S. Molecular characterization and allergenic activity of *Lyc e 2* (betafructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *Eur J Biochem* 2003; 270 (6):1327-37.

Wide L, Bennich H, Johansson S G O. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2: 597

Whitaker TB, Williams KM, Trucksess MW, Slate AB. Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *J AOAC Int.* 2005; 88(1):161-74.

Wigotzki M, Steinhart H, Paschke A. Determination of the allergenicity of various hazelnut products by immunoblotting and enzyme allergosorbent test inhibition. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001; 756(1-2): 239-48

Willerroider M, Fuchs H, Ballmer-Weber BK, Focke M, Susani M, Thalhamer J, Ferreira F, Wüthrich B, Scheiner O, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K. Cloning and molecular and immunological characterization of two new food allergens, *Cap a 2* and *Lyc e 1*, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131 (4): 245-55

Wilson S, Blaschek K, Gonzalez de Mejia E. Allergenic Proteins in Soybean: Processing and Reduction of P34 Allergenicity. *Nutrition* 2005; 63 (2): 47-58

Wood RA: The natural history of food allergy. *Pediatrics* 2003; 111:1631-7.

Woods RK, Thien F, Raven J, Walters EH, Abramson MA: Prevalence of food allergies in young adults and their relationship to asthma, nasal allergies, and eczema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 183-9.

Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(4): 752-62

Yamada S, Nolte H, Zychlinsky E. Identification and characterization of allergens in two species of tuna fish. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999; 82(4): 395-400

Yamanishi R, Tsuji H, Bando N, Yoshimoto I, Ogawa T. Micro-assay method for evaluating the allergenicity of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K, with mouse antiserum and RBL-2H3 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997; 61(1): 19-23

Yamashita H, Nanba Y, Onishi M, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Identification of a wheat allergen, Tri a Bd 36K, as a peroxidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2487-90

Yeung JM, Collins PG. Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. *J AOAC Int*. 1996; 79(6): 1411-6

Yeung JM, Newsome WH, Abbott MA. Determination of egg proteins in food products by enzyme immunoassay. *J AOAC Int* 2000; 83:139-43

Yu CJ, Lin YF, Chian BL, Chow LP. Proteomics and Immunological analysis of a novel shrimp allergen, *Pen m* 2. *J Immunol* 2003; 170: 445-53

Zapatero Remon L, Alonso Lebrero E, Martin Fernandez E, Martinez Molero MI. Food-protein-induced enterocolitis syndrome caused by fish. *Allergol Immunopathol* 2005; 33(6): 312-6

Zhang JW, Mine Y. Characterization of IgE and IgG epitopes on ovomucoid using egg-white-allergic patients' sera. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 253(1): 124-7.

Zeiger RS, Sampson HA, Bock S., Burks AW, Harden K, Noone S, Martin D, Leung S, Wilson G. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *J. Pediatr*. 1999; 134: 614-22

Zuberbier T, Edenharter G, Worm M, Ehlers I, Reimann S, Hantke T, Roehr CC, Bergmann KE, Niggermann B: Prevalence of adverse reactions to food in Germany- a population study. *Allergy* 2004; 59: 338-45.

ANNEXES

annexe 1 :

M.Morisset.
Double Blind Trial of a Fermeted Infantile Formula in Cow's Milk Allergy prevention.
Publication personnelle en cours.
Communication affichée acceptée pour l'AAAAI meeting, Philadelphie 2008.

annexe2 :

M.Morisset et al.
Intérêt diagnostic des allergènes recombinants en allergie alimentaire.
Avant présention orale pour le Congrès Francophone d'Allergologie, Paris, 9-11 avril 2008
Rev Fr Allergol Immunol Clin 2008 ; 48(3): 242-5. ISSN : 0335-7457

annexe 3 :

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guénard L, Beaudouin E, Flabbée J, Hatahet R.
Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges.
Clin Exp Allergy. 2003; 33(8): 1046-51.

annexe 4 :

Morisset Martine [1], Moneret-Vautrin Denise-Anne [1], Sergeant Patricia [1], Lemerdy Philippe [2], Codréanu Fanny [1], Kanny Gisèle [1]
Assessment of the potential risk of peanut oil in peanut-allergic children
Risk assessment of peanut oil allergy
Submitted manuscript PAI-06-O-0205- Pediatry Allergy and Immunology
Réadressé après correction, selon la suggestion des reviewers, le 16 octobre 2007

annexe 5 :

Astier C, **Morisset M**, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, Ogier V, Petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks AW, Bihain B, Sampson HA, Kanny G.
Predictive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy.
J Allergy Clin Immunol. 2006; 118(1): 250-6.

annexe 6 :

Moneret-Vautrin DA, **Morisset M**, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G.
Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk.
Allergy 2006; 61(4): 507-8

annexe 7 :

Tiger Lee TT, Morisset M, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, Codreanu F, Bihain BE, Kanny G.
Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy.
J Allergy Clin Immunol. 2007 119(3):746-7.

annexe 8 :

Morisset M, Astier C, Codreanu F, Cordebar V, Commun N, Kanny G, Moneret-Vautrin.
Allergy to cow milk proteins contaminating lactose, common excipient of dry powder inhalers for asthma. An original masked food allergy clinical case.
Communication affichée, Congrès de l'EFIM, *European Federation of Internal Medicine. Paris septembre 2005.*
Communication affichée pour le congres de l'American Academy of Asthma and Allergy and Immunology, février 2006.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006, 117(supl 1), p S95. Poster 369.

annexe 9 :

Morisset M, Lee T, Codreanu F, Cordebar V, Fremont S, Guenard L, Kanny G, Moneret-Vautrin DA.
Allergy to an amino-acid formula in infants: residual soy allergens in soybean oil are incriminated.
Poster présenté au *congrès de l'American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Miami, mars 2006.*
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117, issue 2, suppl 1, feb 2006, s40

annexe 10

Moneret-Vautrin DA, **Morisset M**, Flabbee J, Kanny G, Kirch F, Parisot L.
Unusual soy oil allergy.
Allergy 2002; 57(3): 266-7.

annexe 11 :

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G and the other members of the Allergo-vigilance members.
Prevalence of peanut sensitization in a population of 4737 subjects- An allergovigilance network enquiry carried out in 2002.
European Annals of Allergy and Clinical Immunology 2005; 37(2): 54-7.

annexe 12 :

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, Cuny JM, Frentz P, Hatahet R, Hanss Ch, Beaudouin E, Petit N, Kanny G.
Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy.
Allerg Immunol. 2007; 39(1): 12-9.