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 HENRI POINCARE – NANCY I

UFR PHARMACIE

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 Novembre 2008

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE – NANCY I

Mention : Biologie cellulaire et Nutrition

Par FRANCK PATRICIA

INFLUENCE DES PROCEDES INDUSTRIELS SUR L'ALLERGENICITE DES ALIMENTS

Membres du jury :

Juges :
- Pr Finance Chantal (Nancy)
- Pr Kanny Gisèle (Nancy)
- Dr Bihain Bernard (Nancy)
- Dr Sainte-Laudy Jean (Limoges)
- Pr Parent – Massin Dominique - Rapporteur (Brest)
- Pr Defzoulian Bita – Rapporteur (Liège)

Membres invités : Pr Nabet Pierre (Nancy)
Pr Mejean Luc (Nancy)

EA 3999 - Maladies allergiques : Diagnostic et Thérapeutique.
Laboratoire de Médecine et Thérapeutique Moléculaire, 15 rue du bois de la Champelle - 54500 Vandoeuvre les Nancy
Laboratoire de Biochimie, CHU, Hôpital Central – 54000 Nancy

INFLUENCE DES PROCEDES INDUSTRIELS

SUR L'ALLERGENICITE DES ALIMENTS

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Nabet. Votre présence m'honore. A vos côtés j'ai tout appris de la biologie clinique mais surtout vous m'avez transmis votre passion pour les techniques innovantes voire futuristes. Avec toute ma reconnaissance, mon admiration et ma gratitude.

A Madame le Professeur Moneret-Vautrin. Merci de m'avoir permis de faire un bout de chemin à vos côtés, sur la voie de votre connaissance absolue de l'allergie. Avec toute mon admiration et ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Kanny. Vous avez accepté la direction de cette thèse et je vous en remercie. Vos conseils pertinents et votre jugement avisé ont guidé ce travail. Votre soutien dans les moments difficiles m'a beaucoup aidée. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié.

A Madame le Professeur Parent-Massin. Vous nous faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Trouvez ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A Madame le Professeur Dezfoulian. Vous nous faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Trouvez ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

A Madame le Professeur Finance, qui nous fait l'honneur de juger cette thèse. Trouvez ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de nos remerciements.

A Monsieur le Professeur Méjean. Avec tous mes remerciements et ma reconnaissance d'avoir accepter de participer à ce jury.

A Monsieur le Docteur Bihain. Votre envie de recherche, votre dynamisme à créer, votre optimisme et toutes vos connaissances emmèneront haut vos équipes. Avec tous mes remerciements d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur Saintelaudy. Votre passion pour la biologie est remarquable et votre expertise éclaire d'un regard nouveau notre travail. Avec toute ma reconnaissance et mon amitié.

A Eric, tu me manques.

A Francine, je vous dédie ce travail.

A Mary Ann, Thérèse, Bernadette, Francine, mes amies de toujours, pour toujours.

A Régine et Jean François. Mes si précieux professeurs Géotrouvetou, sans qui ce travail ne serait pas. Avec toute mon amitié et mon affection.

A l'ensemble du personnel du Laboratoire de Biochimie. A vos côtés, le travail fut toujours un plaisir. Vos compétences, votre motivation, votre bonne humeur ont été le moteur de notre collaboration. Avec toute ma sincère amitié.

A Fanny, Ludivine, Simone, Patricia, Martine…. Et à l'ensemble du personnel du service de "Médecine D"! Pour tous nos échanges, toujours dans la bonne humeur. Avec tous mes remerciements

A toute l'équipe du laboratoire MTM, avec mention spéciale pour Catherine. Merci et bravo pour votre professionnalisme.

A Bénédicte, Marion, Valérie, Marie Claude, Anne, Maud. Vous êtes là, merci.

A Martine et Jean Marie. Rencontre exceptionnelle avec des êtres exceptionnels. Avec toute ma gratitude, mon amitié et mon affection.

A mes amis.

A ma famille.

A Pierre, Pauline, Romain et Justine, ma source de vie, mon puits d'amour.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

TABLEAUX & FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

PARTIE I : LES ALLERGENES ALIMENTAIRES
SITUATION DU SUJET & DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. **L'EVOLUTION DE L'ALIMENTATION ……** p.4

I.1.Les aspects sociologiques p.4
- Conditions de vie et pratiques domestiques
- Structure sociale des consommations
- Les évolutions contemporaines

I.2. Les aspects géopolitiques p.7

I.3. Evolution de l'alimentation et pathologies p.7

II. **EPIDEMIOLOGIE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE……** p.8

II.1. Prévalence p.8

II.2. Méthodes diagnostiques p.10

II.2.1. Interrogatoire clinique p.11
II.2.2. Tests in vitro p.11
II.2.3. Tests in vivo p.13
II.2.4. Tests cellulaires p.14

III. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE…… p.20

III.1. Absorption et présentation de l'allergène p.21

III.2. La réaction allergique au niveau cellulaire p.22
III.2.1. Le déséquilibre de la balance Th1/Th2 p.22
III.2.2. Le rôle des cellules régulatrices p.23

III.3. Hypersensibilité de type immédiat p.24

III.4. Les facteurs impliqués dans l'induction de la tolérance orale ou de l'hypersensibilité.
III.4.1. Facteurs génétiques p.25
III.4.2. Facteurs environnementaux p.25
III.4.3. Facteurs liés à l'antigène p.27

IV. **LES ALLERGENES……** p.28

IV.1 Définitions des allergènes p.28

IV.2 Nomenclature des allergènes p.29

IV.3 Structure moléculaire des allergènes alimentaires p.30

IV.3.1. Les allergènes protéiques d'origine végétale p.30
- Classification des protéines p.30
- La superfamille des prolamines p.31
- La superfamille des cupines p.33
- La superfamille Bet v 1 p.35
- Les profilines p.36
-

IV.3.2. Les Allergènes d'origine animale p.39

IV.4 Peut-on prédire l'allergénicité d'une protéine ? p.39

V. MODIFICATIONS DE L'ALLERGENICITE PAR LES PROCEDES INDUSTRIELS…… p.41

V.1. ALLERGENICITE ET PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES p.42

V.1.1. Transformations physico-chimiques des protéines p.42

V.1.2. Traitement thermique et allergénicité p.44
1. Le chauffage réduit l'allergénicité
2. Le chauffage ne modifie pas l'allergénicité
3. Le chauffage augmente l'allergénicité

V.1.3. Traitement non thermique et allergénicité p.47

1. La protéolyse
2. La fermentation

V.2. ALLERGENICITE DES NOUVEAUX INGREDIENTS ALIMENTAIRES p.49

V.3. ALLERGENICITE ET BIOTECHNOLOGIES p.49

PARTIE II : PROCEDES INDUSTRIELS ET ALLERGENICITE
TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. **TRAITEMENT THERMIQUE ET ALLERGENICITE** p. 55

- Présentation des travaux (1): The allergenicity of soybean-based products is modified by food technologies. Int arch allergy Immunol 2002; 128:212-219.

- Présentation des travaux (2) : A propos d'un cas : Drôle de poulet ! p.63

II. ALLERGENICITE DES NOUVEAUX INGREDIENTS ALIMENTAIRES …… p.66

II.1. ALLERGENICITE DE L'INULINE p.66

- Présentation des travaux: Anaphylactic reaction to inulin: First identification of specific IgEs to an inulin protein compound. Int Arch Allergy Immunol; 2005. 136: 155-158.

II.2. ALLERGENICITE DU LIN p.72

- Présentation des travaux (1) *:* Anaphylaxis to flaxseed**.** p.73

- Présentation des travaux (2) *:* Etude prospective de la sensibilisation et de l'allergie au lin menée chez 1317 patients. p.78

III. ALLERGENICITE ET BIOTECHNOLOGIES : LES PROTEINES RECOMBINANTES …… p.87

III.1. LES ALLERGENES RECOMBINANTS : OUTILS DIAGNOSTIQUES

- Présentation des travaux: In vitro analysis of peanut allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test**.** p.87

III.2. NOUVEAUX INGREDIENTS ISSUS DES BIOTECHNOLOGIES

- Présentation des travaux : Evaluation of the risk of cross reactivity between hen's egg lysozyme and rice originated recombinant human lysozyme, by ELISA and ELISA inhibition tests and basophil activation tests. p.105

PARTIE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES p.111

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p.114

ANNEXES

Annexe 1 : Publications et travaux présentés dans la thèse…… p.122

Annexe 2 : Autres travaux de l'auteur dans le domaine de l'allergie p.154

TABLEAUX & FIGURES

TABLEAUX

Tableau I : Les allergènes protéiques d'origine végétale

Tableau II : Immunoblot : Poids moléculaire (kDa) des protéines d'extraits de soja, détectées par fixation des IgE spécifiques.

Tableau III : Principaux allergènes du soja décrits dans la littérature

Tableau IV : Poids moléculaires (kDa) des protéines des extraits de protéines de produits dérivés de soja

Tableau V : Sensibilisation à la graine de lin explorée par Prick-in-prick

FIGURES

Figure 1 : Balance Th1/Th2 et sa régulation

Figure 2 : Fonctions des cellules T régulatrices

Figure 3 : Différentes étapes de la réaction de Maillard

Figure 4 : Etapes du procédé de traitement des graines de soja

Figure 5 : Produits dérivés du soja, obtenus à partir des flocons délipidés

Figure 6 : Electrophorèse SDS PAGE des protéines de soja

Figure 7 : Immunoblot réalisé avec le sérum d'un patient allergique au soja

Figure 8 : Modifications structurales au cours du procédé d'extrusion

Figure 9 : Electrophorèse SDS PAGE d'extraits de produit dérivés du soja

Figure 10 : Immunoblot réalisé avec le sérum de la patiente

Figure 11 : Chromatographie sur couche mince des sucres

Figure 12 : Dot Blot - Inuline

Figure 13 : Inhibition du dot blot - Inuline

Figure 14 : SDS PAGE des extraits de lin

Figure 15 : Immunoblot - Lin réalisé avec le sérum de la patiente A

Figure 16 : SDS-PAGE (8-25%) of different protein extracts stained with Coomassie brillant blue (Lin)

Figure 17: Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectroscopy

Figure 18: Immunoblot carried out with the serum of a sensitized patient - (Lin)

Figure 19 : Inhibition d'ELISA (Lysozyme)

Figure 20 : BAT : Pourcentage de basophiles activés CD63+ après activation par HEL, rhuL 85%, rhuL 95% et BML.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Allergie alimentaire

AAAAI : American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

CDD : cross reactive carbohydrate determinant

CMF : Cytométie en flux

EAACI : European Academy of Allergology and Clinical Immunology

IgEs : immunoglobulines E spécifiques

IL : Interleukine

INF-γ : Interféron gamma

KDa : Kilo Dalton

FOXP3 : forkhead box P3 (facteur de transcription)

GATA-3 : GATA binding protein 3 (globin transcription factor)

OMS : Organisation mondiale de la santé

RAST : Radio Allergo Sorbent test

STAT-4: Signal Transducers and Activators of Transcription 4 (facteur de transcription)

STAT-6: Signal Transducers and Activators of Transcription 6

Th : Lymphocyte T Helper

TGF-β : Tumor growth factor

TNF -α : Tumor necrosis factor

TPO : test de provocation orale

VRS : Virus respiratoire synthicial

INTRODUCTION

L'allergie alimentaire est une pathologie en constante augmentation. Sa prévalence en Europe est actuellement d'environ 4.7% chez l'enfant et d'environ 3.2% chez l'adulte (Moneret-Vautrin 2008). Les huit aliments les plus souvent incriminés sont l'œuf, le lait, l'arachide, les fruits à coque, la farine de blé, le soja, le poisson et les fruits de mer. L'allergène est le plus souvent d'origine protéique mais d'autres composés alimentaires ont pu être mis en cause comme les colorants alimentaires, les fibres alimentaires ou encore les aromes.

L'allergie alimentaire correspond à une rupture de tolérance. Elle traduit la mise en place d'une réponse immunitaire le plus souvent de type IgE dépendante vis-à-vis de l'aliment.

Si aujourd'hui les mécanismes physiopathologiques de la réaction allergique sont bien connus, il reste en revanche un certain nombre de questions sans réponse quant aux mécanismes de déclenchement du processus allergique.

Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer cette réaction anormale et c'est probablement la conjonction de différents facteurs qui favorise la réponse immunitaire dans le sens d'une réponse IgE. Ces facteurs sont : des facteurs génétiques de prédisposition, une pathologie virale sous jacente entraînant une dysrégulation du processus immunitaire, des modifications des phénomènes de digestion, une immaturité du tube digestif du nourrisson, une modification de l'environnement du sujet (dans le cadre de la théorie hygiéniste), des facteurs iatrogéniques, une modification de l'alimentation. Les habitudes alimentaires (c'est-à-dire le mode de préparation et de consommation) constituent un facteur déterminant de l'émergence d'une allergie alimentaire (Wal 2004).

La modification de l'alimentation regroupe différents aspects. Un aspect géopolitique concerne la mondialisation des échanges des denrées mettant en présence des individus avec des allergènes inconnus engendrant de nouvelles allergies alimentaires et de nouvelles réactions croisées entre espèces. Un aspect sociologique concerne la transformation des habitudes alimentaires (horaires des repas, préparation des plats, origine des denrées..) dans les différents groupes de la société au cours du temps. Enfin la modification de l'alimentation est liée aussi à l'évolution des techniques industrielles et des biotechnologies. Cette évolution concerne les avancées dans le cadre de l'agriculture permettant une augmentation des rendements associant des modes de cultures très différents de l'agriculture traditionnelle et l'usage de produits pesticides et engrais en constante progression. L'évolution de l'alimentation passe aussi par l'évolution des aliments eux-mêmes avec la transformation des produits par les procédés industriels. Des protéines natives peuvent être totalement modifiées

au cours des process et peuvent présenter des propriétés allergéniques complètement différentes de celles de la protéine native.

Dans notre travail, nous nous intéresserons à la modification de l'allergénicité, liée à la transformation des aliments par les procédés industriels à partir de l'exemple du soja texturé ou du lin extrudé ou liée à la présence de nouveaux ingrédients entrant dans la composition des aliments, comme l'inuline utilisée comme fibre ou encore le lin source de lipides oméga 3. Ces travaux évalueront les modifications structurales des protéines par électrophorèse et par spectrométrie infrarouge. La modification de l'allergénicité des protéines sera abordée par des méthodes d'immunoblot ou de dot blot.
L'allergénicité des protéines recombinantes sera évaluée, soit en les utilisant comme outil diagnostic dans l'allergie à l'arachide par comparaison aux protéines natives, soit en déterminant l'allergénicité d'un lysozyme humain recombinant destiné à l'alimentation.

PARTIE I

SITUATION DU PROJET & DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

LES ALLERGENES ALIMENTAIRES

I. L'EVOLUTION DE L'ALIMENTATION

Environ 20% de la population modifie son régime alimentaire à cause de réactions indésirables en relation avec les aliments. Les causes sont variables et peuvent être une réaction immunitaire à une protéine alimentaire. Il s'agit alors d'une allergie alimentaire. Mais des réactions indésirables peuvent être dues à une intolérance métabolique (intolérance au glucose, alcoolisme), une réaction due à une activité pharmacologique (caféine, tyramine) ou toxique d'un aliment (toxines bactériennes) (Sicherer 2006).

Selon la définition de la FAO, la sécurité alimentaire est atteinte lorsque « tous les êtres humains ont, à tout moment, un accès physique et économique à une nourriture suffisante, saine et nutritive, leur permettant de satisfaire leurs besoins énergétiques et leurs préférences alimentaires afin de mener une vie saine et active ». Cette définition prend des sens différents au Nord et au Sud. Dans les pays pauvres, on continue à la traduire en anglais par « food security ». La question principale consiste à savoir s'il y a des denrées alimentaires en quantité suffisante afin de nourrir tout le monde au cours d'une année. En revanche dans les pays riches la traduction en anglais est « food safety » laissant apparaître un aspect qualitatif.

Cette nuance majeure de la définition de la sécurité alimentaire entre les hémisphères résulte de l'évolution majeure des modes alimentaires dans l'hémisphère Nord (Charvet 2006).

Les modes alimentaires ont en effet subi différentes influences liées à des données sociologiques, géopolitiques et technologiques.

I.1 LES ASPECTS SOCIOLOGIQUES (Régnier 2006)

L'évolution de l'alimentation et les rapports à l'alimentation sont perceptibles dans l'historiographie de l'alimentation. En 1961, les études portaient sur la vie matérielle et les comportements biologiques, puis une orientation anthropologique a dirigé les études vers les pratiques alimentaires et sur le goût. Actuellement, les préoccupations s'ouvrent sur les notions de risque et de sécurité.

Entre 1965 et 1986 une enquête annuelle, puis bisannuelle en 1987 et 1991 est menée sur la consommation alimentaire (enquête INSEE : enquête permanente de consommation alimentaire. En 1999, une enquête individuelle nationale de consommation alimentaire (INCA) est conduite sous l'égide de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments

(AFSSA. Elle aborde un contexte de santé publique en mesurant les évolutions des consommations alimentaires et en évaluant leurs incidences alimentaires.

Conditions de vie et pratiques domestiques

Depuis 1960, la consommation alimentaire s'est significativement modifiée. La consommation de lait en vrac, de pomme de terre, de sucre sous sa forme solide, de vins courants, des viandes de bœuf et de veau, les farines, du beurre et des huiles a fortement diminué (Charvet 2006) tandis que celle de jambon blanc, de fromage, des eaux minérales, des jus de fruit et des produits laitiers a très largement augmenté. On mange actuellement quinze fois plus de yaourts et de desserts lactés qu'en 1960. Sur la période 1980 – 2001, dans l'union européenne, les produits alimentaires dont la consommation a le plus augmenté sont les jus de fruits (consommation multipliée par quatre), les condiments et les sauces, les produits laitiers frais, les crèmes glacées (consommation multipliée par deux), les vins de qualité, les poissons, les fruits et légumes, les viandes de volaille et de porc. La consommation de pain et de produits à base de céréales a également augmenté mais de façon plus modérée.

L'évolution du panier s'oriente vers davantage de produits transformés. La consommation de plats cuisinés a augmenté de plus de 5% par an entre 1960 et 1980 et de 5% par an entre 1980 et 2001 (Charvet 2006); cette évolution est liée aux facteurs sociodémographiques qui affectent le temps de préparation des repas : allongement des trajets domicile-travail, accroissement du temps consacré aux loisirs, augmentation du pouvoir d'achat, augmentation du travail féminin, augmentation du niveau de vie des ménages. En outre les progrès de la scolarisation féminine ont pu contribuer au déclin des aliments réprouvés sur le plan diététique (graisses, sucres, alcools) et au succès des aliments perçus comme sains (yaourts, fromage blanc, jus de fruits).

Le cadre du repas a lui aussi changé. Le modèle du repas français est basé sur un service simplifié (dit à la russe) incluant potage, entrée, rots (viande, volaille, gibier) et entremets (légumes verts et fruits cuits) puis desserts. Les horaires des repas trouvent leurs origines dans l'institution scolaire. L'évolution contemporaine tend vers une déstructuration de ce modèle : fractionnement des prises alimentaires, simplification des repas principaux, imprécision des horaires entre les repas, effacement de la frontière entre repas ordinaire et festif. Cependant la structure des trois repas concerne neuf français sur dix.

Structure sociale des consommations

La diffusion des goûts s'effectue le plus souvent en cascade c'est-à-dire du haut vers le bas de la société. Les classes dominantes sont à l'origine des innovations, ensuite adoptées par les classes moyennes. Par exemple, la consommation des fruits exotiques, les yaourts, les jus de fruits, le vinaigre balsamique fut d'abord l'apanage des catégories supérieures. A l'inverse, certaines diffusions peuvent aller du bas vers le haut, par exemple l'utilisation du congélateur très large dans les années 1960 dans le milieu agricole et qui se développera dans les années 1970 par les ménages urbains.

Cette diffusion des pratiques peut également s'observer entre les appartenances géographiques : rurale ou urbaine, provinciale ou parisienne entraînant des habitudes de consommation différentes.

Le revenu exerce un impact indirect sur les dépenses pour l'alimentation. Pour un même budget, un ouvrier et un employé ne consomment pas de la même façon : plus de jambon, viande et saucisses pour les employés, plus de graisses et pomme de terre chez les ouvriers. L'alimentation paysanne a pour trait caractéristique l'importance de l'autoconsommation ainsi que des habitudes anciennes (soupe quotidienne, influence des rythmes naturels liés aux saisons) et la surconsommation d'aliments réputés traditionnels (pain, pâtes, café). L'industrialisation, l'urbanisation et l'élévation du niveau de vie n'ont pas systématiquement contribué à un nivellement des consommations.

Si l'appartenance sociale reste le facteur le plus déterminant en terme de produits consommés, il existe une variation régionale de la consommation résultant de la combinaison de facteurs agricoles (zone de production, ressources agricoles), de facteurs culturels (traditions culinaires) et de facteurs sociaux.

Les évolutions contemporaines

Le terme de « malbouffe » largement utilisé actuellement recoupe différents sens. Il associe certaines conditions de production (grands groupes industriels) et de distribution (grandes surfaces), certains modes de consommation (restauration rapide). Le terme porte en outre un jugement péjoratif sur la qualité nutritionnelle et sanitaire de l'alimentation. Pourtant différents travaux montrent une association positive entre industrialisation et qualité des aliments. Le développement des normes de qualité et la législation assure la qualité des produits et la sécurité sanitaire. Les aspects nutritionnels sont également améliorés grâce à la diminution des prix liés à la production et à la distribution à grande échelle.

La « malbouffe » touche davantage les fractions non favorisées qui privilégient les produits industriels moins chers mais à teneur plus élevée en graisses et en sucres.

I.2 LES ASPECTS GEOPOLITIQUES

La mondialisation : flux de produits, flux d'hommes

Les progrès dans les transports et les techniques de conservation et de production ont entraîné une généralisation et une accélération des flux des produits. De plus, la baisse des coûts a étendu la disponibilité des produits importés, réservés auparavant à une élite fortunée. Enfin les flux de migration et touristique viennent contribuer aussi à ce phénomène de mondialisation. La migration conduit à la mise en contact de systèmes alimentaires différents : ceux de la société d'accueil et ceux des migrants. Cette confrontation conduit à des modifications des pratiques alimentaires des migrants, modifications liées à l'approvisionnement, au budget, aux modes de préparation et de cuisson.

En plus des flux migratoires, les cuisines exotiques se diffusent largement au sein du processus de mondialisation. En réponse à la crainte d'une uniformisation des produits et des pratiques, l'attrait pour les produits du terroir s'est accru. Cependant les cuisines locales sont soumises à un processus de sélection et de recomposition. Il s'agit de normaliser et codifier les plats locaux afin de passer de la simple cuisine paysanne à la gastronomie régionale !

I.3 EVOLUTION DE L'ALIMENTATION ET PATHOLOGIES

En terme de pathologies, l'évolution de l'alimentation a vu se développer les maladies cardiovasculaires et le diabète sans pour autant résoudre tous les problèmes de malnutrition.

L'obésité affecte inégalement les pays riches. Elle ne touche que 3% des japonais, 11% des italiens, plus de 20% des anglais et plus de 30% des américains. En France, la progression est récente, 7% jusqu'en 1992, elle passe à 10% en 2001. L'obésité est inégalement distribuée selon les milieux sociaux. Dans les pays développés, les individus les plus riches et les plus diplômés sont les moins touchés. La corpulence chez les femmes est liée au statut social : elle augmente avec l'âge et diminue avec le niveau de diplôme ainsi qu'avec le revenu personnel. Ces différences tiennent à différents facteurs liés aux modèles alimentaires et aux modes de vie. En France, on compte 16% d'obèses chez les ouvrières contre 4% chez les cadres.

De même la fréquence de l'allergie alimentaire a fait l'objet de différentes études mettant en évidence certaines caractéristiques de cette pathologie émergente : les citadins sont plus

touchés que les ruraux, les personnels de santé sont plus atteints que les autres professionnels. Il existe peu de d'informations sur les populations immigrées (Moneret-Vautrin 2008).

II. EPIDEMIOLOGIE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

II.1 PREVALENCE

Il existe une très large hétérogénéité entre les études portant sur l'évaluation de la prévalence de l'allergie alimentaire. Les méthodologies varient et peu d'études ont retenu le test de provocation orale en double aveugle comme gold standard du diagnostic. Ainsi beaucoup de travaux ont été basés sur la perception des manifestations cliniques, entraînant une surestimation de la prévalence. En outre l'absence de standardisation des allergènes utilisés dans les différentes études, la faible spécificité des tests cutanés pour le diagnostic d'allergie alimentaire (les tests cutanés sont le marqueur de la sensibilisation cutanée) et du dosage des IgE spécifiques n'ont pas permis d'obtenir des mesures objectives. Ces tests peuvent être pris en défaut en raison de sensibilisations qui ne correspondent pas à des allergies vraies mais à des réactivités croisées (ex : pollen-fruits).

La méta analyse de Rona and al (2007) montre d'importantes variations des chiffres de prévalence : Globalement la prévalence de l'allergie alimentaire varie de 3 à 35% tout aliment confondu. En affinant en fonction des allergènes elle varie de 1,2% à 17% pour l'allergie au lait, 0,2 à 7% pour l'œuf, 0 à 2% pour la cacahuète et le poisson, 0 à 10% pour les crustacés.

L'épidémiologie de l'allergie alimentaire varie en fonction de l'âge, des allergènes, des organes atteints et des mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

La fréquence des allergies alimentaires dépend de l'âge de l'individu. L'allergie alimentaire est beaucoup plus fréquente chez l'enfant. L'incidence est évaluée entre 5 et 10% chez l'enfant de moins de huit ans. Aux Etats-Unis environ 6% des enfants souffrent d'allergie alimentaire et 3,7% des adultes (Sicherer 2006).

Les allergènes incriminés sont essentiellement d'origine animale dans la petite enfance pour être progressivement remplacés par des allergènes végétaux chez les adultes. Les allergènes responsables de 82% des allergies chez l'enfant de moins de 15 ans sont le lait de vache

(2,5%) l'oeuf de poule (1,3%), l'arachide (0,8%), le blé (0,4%), le soja (0,4%), le poisson (0,1%) et les crustacés (0,1%) (Sicherer 2006).
L'allergie au lait de vache apparaît dans 50% des cas avant l'âge d'un an et dans 90% des cas avant l'âge de 5 ans. Une réactivité croisée est retrouvée à 90% avec le lait de chèvre ou brebis et aussi à 25% avec le soja (Hermans 2005). L'allergie à l'œuf survient entre 6 mois et 3 ans. Près de la moitié des enfants deviendront tolérants.
Chez l'adulte, les allergènes les plus souvent incriminés sont les crustacés (2%), l'arachide (0,6%), la noisette (0,5%), le poisson (0,4%). Les réactions aux drupacées sont fréquentes (5%) mais généralement les manifestations cliniques sont moins sévères.
Le nombre d'aliments incriminés augmente également en parallèle avec le développement des allergies respiratoires dues aux pollens des plantes (Wal 2003). Il existe de grande variation de prévalence pour différents allergènes sur un axe Nord/sud en Europe. Cette variation peut probablement être expliquée par le même gradient Europe du Nord/Europe Centrale d'exposition aux allergènes polliniques (Poulsen 2005).
L'allergie au bouleau est fréquemment associée à une réaction croisée avec les drupacées (pommes, poires, pêches, abricot, prune), les kiwis, les noix, les noisettes et les amandes. L'allergie aux ombellifères est associée à une réaction croisée au céleri, carottes et pommes de terre.
L'allergie aux pollens d'armoise, parfois combinée à ceux du bouleau peut être associée à une allergie croisée aux carottes, aux épices, à la moutarde, au tournesol, à l'anis, au fenouil, à la coriandre, au cumin.
Les allergies aux pollens de graminées peuvent combiner une allergie au melon, à la pastèque, aux oranges, aux tomates, aux pommes de terre, à la cacahuète et aux arachides.
L'allergie aux pollens de platane est associée aux noisettes, pêches, melons, kiwis, cacahuète, maïs, pois chiche, laitues, haricots.

La détermination de la prévalence de l'allergie alimentaire est modulée dans le temps, en fonction de différents facteurs environnementaux et de la consommation alimentaire. Le recul de l'allergie au lait de vache pourrait s'expliquer dans le temps par une évolution de la consommation de lait avec en particulier l'utilisation plus large des formules infantiles (Poulsen 2005). L'allergie à l'arachide chez les enfants américains a doublé dans les cinq dernières années (Sicherer 2006).

En outre de nouveaux risques allergiques sont décrits, liés à la consommation d'allergènes dits émergents (Moneret 2008) : quinoa, orge vert, farine de lupin, lait de brebis et de chèvre, sarrasin, isolats de blé…

L'anaphylaxie sévère IgE dépendante a été étudiée plus précisément ces dernières années. Elle représente un cas pour 10000 habitants. L'augmentation est de 28% sur les six dernières années. Le risque anaphylactique augmente avec l'âge mais l'évolution actuelle montre aussi une augmentation drastique chez les enfants (Moneret 2008).

La diversité des études et des données sur l'épidémiologie des allergies alimentaires n'ont pas permis jusqu'à présent d'établir véritablement les bases d'une politique de sécurité alimentaire ni au niveau des industries alimentaires, ni au niveau des réglementations. Le projet européen EuroPrevall inclut 56 partenaires de 21 pays dont 19 européens ainsi que la Chine, l'Inde et le Ghana. Les objectifs du projet sont d'obtenir des informations objectives concernant la prévalence, concernant les groupes d'allergènes. De plus cette étude permettra de suivre l'évolution des allergies dans le temps (sur une période de 10 à 15 ans) et permettra de confirmer ou d'infirmer l'augmentation constante des cas d'allergie alimentaire (Mills 2007).

II.2. METHODES DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic de l'allergie alimentaire repose sur un ensemble de critères cliniques et sur les résultats de tests biologiques réalisés *in vivo* et *in vitro*. Cependant ce qui caractérise ce diagnostic c'est l'absence de tests spécifiques de l'allergie (voire de l'allergène) facilement réalisables. Aujourd'hui le test « gold standard » du diagnostic de l'allergie alimentaire demeure le test de provocation orale (TPO) qui est réalisé en structure hospitalière. C'est le seul test qui permettra de distinguer la simple sensibilisation de l'authentique allergie alimentaire.

L'EAACI et l'AAAAI ont établi des classifications et terminologies pour l'allergie alimentaire qui ont encore été harmonisées par l'OMS (Asero 2007). Cette classification distingue :

- Les réactions toxiques : réactions indésirables qui se produisent chez tous les sujets exposés à une dose suffisante.

- Les réactions non toxiques qui dépendent de la susceptibilité d'un individu à certains aliments :

    Allergies alimentaires (un mécanisme immunologique est en jeu)

    - IgE dépendant
    - Non IgE dépendant

    Hypersensibilités alimentaires non allergiques (anciennement : intolérance alimentaire) qui regroupent les intolérances alimentaires liées à un désordre métabolique (déficit enzymatique), à une intolérance pharmacologique ou à un mécanisme non identifié.

Le diagnostic de l'AA IgE dépendante se décompose schématiquement en trois étapes : 1) L'interrogatoire qui retracera l'histoire clinique, 2) les tests *in vivo* qui demeurent les plus utilisés par les cliniciens, 3) les tests *in vitro* correspondant au dosage des IgE spécifiques. L'exploration pourra être complétée sur le plan biologique par des tests d'activation cellulaire.

II.2.1. L'interrogatoire clinique

L'histoire clinique oriente les investigations : une anaphylaxie aiguë dans l'heure suivant l'ingestion d'un aliment isolé oriente vers le diagnostic d'AA. Dans tous les autres cas, le clinicien devra caractériser la nature de la réaction indésirable, si besoin avec des investigations complémentaires. L'interrogatoire recherchera un certain nombre de caractéristiques de la manifestation allergique : des antécédents d'atopie familiale, le rythme des manifestations, l'association des symptômes, une pollinose persistante, une allergie au latex, une manifestation à l'effort, un asthme, des particularités alimentaires, des dégouts alimentaires, une exposition cutanée ou respiratoire à des aliments (Moneret 2006).

II.2.2. Les tests *in vivo*

Les prick-tests cutanés

Les prick-tests cutanés sont réalisés par l'allergologue. Ils sont peu coûteux et présentent peu de danger. Les résultats sont obtenus en quinze minutes.

Principe du test : l'allergène est introduit dans l'épiderme par une « puncture » épidermique. Le test comporte un témoin négatif composé par un sérum salin : Il permet d'évaluer la réactivité non spécifique de la peau. Le test comporte un témoin positif dans lequel l'allergène

est remplacé par un agent histamino-libérateur, la codéine ou l'histamine. Un test avec l'allergène est positif si la taille de l'œdème équivaut au moins celui du témoin codéine.

Valeur diagnostique : La performance diagnostique du test dépend de la qualité des extraits allergéniques testés. Les meilleures performances sont obtenues avec les aliments natifs. Les pricks tests réalisés chez l'enfant, avec œuf, lait, arachide et poisson ont une excellente sensibilité et une valeur prédictive négative supérieure à 90%, de sorte qu'une réponse négative permet d'exclure une sensibilisation, alors que la spécificité est faible (de 50 à 85%) du fait de l'importance des sensibilisations. Cependant certains extraits commerciaux montrent une faible sensibilité, probablement liée soit à une trop faible concentration de l'allergène, soit à une instabilité des extraits liés à une protéolyse endogène. Dans ce cas les prick-tests réalisés avec les aliments natifs montrent une sensibilité nettement plus élevée (technique des « prick in pricks »). Les allergènes purifiés et les allergènes recombinants peuvent être proposés pour les prick tests conférant une excellente sensibilité et spécificité aux tests (Astier 2006).

Les atopy patch-tests alimentaires

Récemment développés pour explorer une dermatite atopique, ils sont réalisés avec des extraits ou des aliments naturels et la lésion eczémateuse est observée. Leur intérêt est controversé et leur performance est en cours d'évaluation.

Les tests de provocation orale

Les tests de provocation orale (TPO) sont les seuls tests permettant de poser le diagnostic d'AA et qui permettent au clinicien de mettre en œuvre un régime d'éviction. Ils permettent de déterminer la dose réactogène cumulée. Le test de provocation orale en double aveugle est le « gold standard ».

Principe du test : L'aliment est donné au patient, à jeun, à dose croissante. La première dose est calculée pour ne pas entrainer de symptômes et la dose la plus élevée correspond à celle déclenchant les symptômes. Le choix des doses est orienté par l'histoire clinique. Les doses sont données à un intervalle régulier (15 à 60 minutes) jusqu'à l'apparition des symptômes ou jusqu'à une portion normalement consommée. En procédure en double aveugle, l'aliment natif est inclus dans une matrice plus ou moins complexe, non allergénique, correspondant au placebo (purée de pomme de terre, compote..). Un TPO en double aveugle sera considéré comme positif si le test est donné positif avant d'avoir levé l'insu sur les produits testés et que les signes subjectifs et objectifs sont colligés après ingestion du seul aliment.

Ces tests sont réalisables en milieu hospitalier dans des structures dédiées.

Valeur diagnostique du test : Le test est de plus en plus usité mais aucune standardisation n'est véritablement mise en place. Un certain nombre de paramètres sont choisis par les cliniciens réalisant le test : la matrice où est insérée l'aliment, la progression des doses, le volume acceptable du test, l'état de l'aliment administré (frais, cuit, lyophilisé …), la dose minimale, la dose maximale...

Certains TPO donnent des résultats négatifs, mettant en défaut la procédure d'absorption qui ne reproduit pas le mode d'absorption du malade au moment de l'ingestion de l'aliment. L'anaphylaxie alimentaire induite par l'effort est un exemple où le prick test est positif, les IgEs sont détectables mais le TPO demeure négatif puisque la réaction allergique se produit après un exercice physique. D'autres facteurs peuvent accroitre l'absorption intestinale de l'allergène, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'effort, l'alcool ou certaines infections gastrointestinales virales.

II.2.3. Les tests *in vitro*

Dosage des IgE spécifiques (IgEs)

Le dosage des IgE spécifiques est le seul test biologique *in vitro*, actuellement réalisé en routine, interprété par les cliniciens. Le dosage apporte une confirmation de la sensibilisation IgE- dépendante dépistée par les tests cutanés. Il peut être effectué en première intention lorsque les tests cutanés ne sont pas réalisables.

Principe du test : Il s'agit d'une méthode d'immunoanalyse de type sandwich basée sur le principe du RAST (Radio Allergo Sorbent test). L'allergène fixé sur un support fixe les IgE spécifiques du sérum du patient. Ces IgEs seront mises en évidence dans un second temps par un anticorps secondaire anti IgE humaine, marqué.

Valeur diagnostique du test : Le dosage des IgEs est proposé par plusieurs fournisseurs d'analyseurs d'immunoanalyse mais aucune standardisation, ni méthode de référence ne sont disponibles. Les méthodes proposées, basées sur un même principe, différant cependant entre elles par de nombreux paramètres : la nature de l'allergène utilisé, le support sur lequel est fixé l'allergène (nitrocellulose, billes, tubes..), le couplage de l'allergène au support, la nature des anticorps secondaires (pureté, spécificité) et leur marquage (radioisotopique, luminescent, enzymatique..), le mode de révélation de l'anticorps secondaire, l'étalonnage (pas de standard international) et le mode d'expression des résultats (qualitative ou quantitative).

Une approche quantitative des IgE spécifiques est proposée pour les allergènes œuf, lait, arachide et poisson. Des seuils d'IgE ont été établis, seuils déterminant une réactivité clinique avec plus de 95% de certitude. Une corrélation entre la concentration en IgEs et la sévérité de la réaction au TPO en double aveugle a été mise en évidence pour certains allergènes. Cependant ces seuils ont été établis pour une méthode donnée, ils ne sont pas transposables à des méthodes d'autres fournisseurs.

Les données des IgEs doivent être donc interprétées avec beaucoup de prudence par des cliniciens expérimentés car même si la probabilité d'une réactivité allergénique augmente avec l'importance de la sensibilisation (c'est à dire la concentration d'IgEs), il n'existe pas de cut-off absolu.

La sensibilité et la valeur prédictive négative des tests varient d'environ 70% à 100% selon la technique, pour un même allergène. La spécificité et la valeur prédictive varient de 80 à 100%. Au-delà de la variabilité analytique des méthodes utilisées, la complexité de la nature des allergènes et leurs relations taxonomiques influencent la qualité diagnostique du dosage des IgEs. En effet certaines IgEs peuvent avoir une réaction croisée avec des protéines d'une autre source, induisant un résultat positif d'IgEs sans générer de signes cliniques après exposition. Les profilines et les déterminants carbohydrate peuvent présenter une réactivité croisée.

II.2.4. Les tests cellulaires

Les tests cellulaires pour l'exploration *in vitro* de l'hypersensibilité immédiate utilisent le polynucléaire basophile du sang périphérique. Ce leucocyte possède la plupart des propriétés du mastocyte, un récepteur membranaire de haute affinité pour les IgE (FcεR1) et des granulations contenant des médiateurs préformés de l'anaphylaxie. Il est donc un bon témoin de la sensibilisation mastocytaire contre un allergène.

Ces tests sont actuellement des outils spécialisés, pas d'usage courant.

Test de dégranulation des basophiles :

Les granulations des basophiles sanguins sont colorées au bleu de toluidine avant et après contact avec l'allergène. Un comptage au microscope est réalisé : le taux de basophiles ayant dégranulé est obtenu par différence.

Ce test a été abandonné car la lecture au microscope est fastidieuse du fait du faible nombre de basophiles dans le sang circulant et aussi car il s'agit d'une approche indirecte puisque les basophiles activés ne sont pas visibles.

Test d'histamino-libération :

L'histamine est le médiateur préformé des granulations du basophile et du mastocyste. Après activation, la dégranulation du basophile libère l'histamine qui sera dosée dans le surnageant cellulaire. Le test sera réalisé sur sang veineux, hépariné à distance des tests cutanés et du TPO. La stimulation *in vitro* sera réalisée avec des doses croissantes d'allergènes, un témoin positif sera réalisé en présence d'un anticorps anti-IgE. Le surnageant cellulaire sera recueilli et l'histamine sera dosée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'histamine libérée par rapport au contenu total de l'histamine contenu dans les cellules sanguines. Le dosage de l'histamine est réalisé par une méthode radioimmunologique, immunoenzymatique (ELISA) ou en fluorimétrie.

La sensibilité et la spécificité du test sont très variables selon les études et les allergènes étudiés. Pour des allergènes alimentaires la sensibilité est d'environ 50% et la spécificité de 80%. Comme pour les autres tests diagnostiques, le manque de standardisation constitue une difficulté pour l'utilisation de ce test, en particulier les caractéristiques de l'allergène et le choix de la gamme de dilutions propre à chaque allergène.

Test de libération des leucotriènes

Les leucotriènes sont des médiateurs néoformés après activation des basophiles, dérivés de l'acide arachidonique. Le dosage se pratique après stimulation *in vitro* par l'allergène. Il sera réalisé par une méthode immunoenzymatique (ELISA), par une méthode chromatographique (HPLC, GC-MS, LC-MS). Actuellement la sensibilité du test n'est pas satisfaisante pour un usage plus large.

Le test d'activation des basophiles par cytométrie en flux

Principe du test

Activation des basophiles (Abuaf 2005, Prussin 2003, Kleine-Tebbe 2006, de Weck 2008)

Les mastocytes et les basophiles se caractérisent par la présence sur leur membrane de récepteurs à IgE de forte affinité (FcεRI) et de larges granulations. Ces dernières contiennent une large gamme de médiateurs préformés (histamine, protéases, TNF -α)

Et d'autres néoformés après activation (leucotriènes, prostaglandines et cytokines). L'activation des mastocytes et des basophiles provoquent les réactions d'hypersensibilité de type I. L'activation est déclenchée par le pontage entre deux molécules d'IgE fixées sur les FceRI. Ce pontage peut être réalisé par un allergène possédant au moins deux épitopes distincts pour pouvoir créer ce pontage. Les récepteurs FcεRI qui sont de type ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation module) doivent être agrégés pour induire le signal d'activation et la cascade biochimique.

Après activation des cellules, des protéines stockées dans la cellule sont transloquées sur la membrane du basophile : CD63 (gp53) et CD203c (ectonucleotide pyrophophate/phophodiesterase).

CD63 ou gp 53 ((LAMP)-3 ou lysosyme-associated membrane protein) appartient à la superfamille des protéines transmembranaires de type 4. Elle est intégrée à la membrane des granules basophiles et une expression à la surface cellulaire témoigne de la dégranulation au cours de laquelle il y fusion entre la membrane du granule et la membrane plasmique de la cellule. Le CD63 est aussi exprimé sur les mastocytes, sur les plaquettes activées, sur les macrophages activés.

CD203c (E-NPP3) appartient à la superfamille des enzymes transmembranaires de type II. C'est une ectoenzyme multifonctionnelle qui catalyse le clivage de différentes molécules (Bouzima 2003). L'expression de cet antigène à la surface du basophile est rapidement mise en œuvre après stimulation par un allergène ou un anticorps anti-IgE, laissant suggérer une réserve de la protéine dans la cellule. Le rôle de cette protéine dans le mécanisme allergique n'est pas connu.

Principe du test

A partir de sang total, le pourcentage de basophiles activés va être déterminé par cytométrie de flux (CMF), après marquage des protéines transloquées par des anticorps couplés à un fluorochrome.

Matériels et Méthodes

Les basophiles

A partir du prélèvement sanguin sur héparine, les basophiles vont être activés soit directement dans le sang total (les hématies seront lysées avant la lecture sur le CMF), soit après obtention d'une couche leucocytaire après centrifugation (Buffy coat), soit après séparation des leucocytes sur Ficoll.

Les méthodes avec séparation des cellules permettent un enrichissement de la fraction cellulaire analysée. En revanche ces méthodes sont plus agressives pour les cellules et peuvent entraîner des dégranulations artéfactuelles des basophiles, générant un bruit de fond important en CMF. En outre après séparation Ficoll les plaquettes peuvent adhérer aux basophiles. Elles pourront être éliminées par centrifugation en absence de calcium et magnésium, étape supplémentaire de traitement des cellules (Kleine-Tebbe 2006).

La méthode sur sang total préserve le milieu nutritif du basophile et limite les manipulations de la cellule. C'est cette méthode que nous avons utilisée. De plus, elle consomme beaucoup moins d'échantillon sanguin.

L'activation

Les basophiles sont mis à incuber en présence de l'allergène 20 minutes à 37°C. La nature et l'origine de l'allergène sont variables et les solutions sont préparées extemporanément selon un mode opératoire propre à chaque laboratoire. Il n'existe pas de solutions commerciales d'allergène destinées au diagnostic in vitro. La solution d'allergène est préparée en PBS le plus souvent. Cependant la matrice de l'allergène étudié peut être glycérolée et il faudra dans ce cas, tester l'impact de la matrice sur l'activation du basophile.

Dans une de nos études, les allergènes testés ont été proposés en solution glycérolée 50% et le glycérol a présenté un effet propre sur la dégranulation du basophile.

Différentes dilutions de l'allergène sont testées afin de déterminer la dilution la plus efficace sur l'activation. Une courbe en cloche est obtenue pour chaque allergène avec une gamme de dilutions. Les dilutions testées sont en général : 1/10, 1/100, 1/1000. Dans nos travaux nous n'avons pas retenu cette méthodologie car elle n'est pas transposable d'une étude à l'autre. Certes nous avons effectué des dilutions mais nous avons travaillé en concentration sur un intervalle de 10^4 et avons testé deux concentrations différentes pour chaque échantillon de patient et pour chaque allergène. A défaut de connaître la concentration en allergène nous avons exprimé la concentration en protéines totales ou en concentration en principe actif pour les médicaments.

L'analyse en CMF

L'analyse par cytométrie en flux est largement répandue dans les domaines de l'immunologie et de l'hématologie pour des marquages et typages cellulaires. Des analyse du métabolisme cellulaire peuvent aussi être réalisées par CMF telles que l'étude du pH intracellulaire, l'étude du flux calcique, l'étude du métabolisme oxydatif, l'étude des mitochondries...Dans le domaine de l'allergologie plusieurs études ont porté sur l'étude des profils cytokiniques.

Le TAB est un test récemment proposé dans le diagnostic de l'allergie alimentaire. Les premiers travaux remontent à une dizaine d'année (Saintelaudy, 1996).Le TAB a surtout été utilisé dans l'allergie au latex (Saintelaudy 1996, Ebo 2002), aux myorelaxants (Abuaf 1999, Monneret 2002, Sudheer 2005, Ebo 2006), aux venins (Saintelaudy 2000, Platz 2001, Lambert 2003), aux betalactamines et aux antiinflammatoires non stéroidiens.

Le TAB dans l'allergie alimentaire a été beaucoup moins exploré. Ce thème sera développé dans la seconde partie de l'ouvrage.

- Le marquage des basophiles peut se faire soit avec un anticorps monoclonal anti CD63 marqué, soit avec un anticorps monoclonal anti CD203c. Les deux marqueurs sont utilisés par les différentes équipes. Cependant CD63 est associé à la dégradation des basophiles, alors que CD203c existe sur les basophiles non activés (à faible niveau) et sur les basophiles activés (Kleine-Tebbe 2006).

- Le Gating (fenêtrage)

Le principe de la cytométrie de flux repose sur la caractérisation individuelle des cellules sur des critères de morphologie, à partir de l'étude de la diffusion de la lumière par la cellule aux petits angles (FS) donnant une indication de taille et de la diffraction aux grands angles (SS) donnant une indication relative du contenu cellulaire et de la granulosité de la cellule. Cette caractérisation est complétée par des critères de fluorescence liés aux marquages spécifiques par des anticorps couplés à un fluorochrome.

Ces différents paramètres morphologiques et de fluorescence permettent de caractériser des sous populations cellulaires et d'étudier une de ces sous populations. C'est le gating (fenêtrage). Dans le TAB, le gating consiste à caractériser la sous population de basophiles puis au sein de cette population cellulaire de déterminer le pourcentage de basophiles activés.

Le gating des basophiles est variable selon les études :

Un protocole en double marquage, consistant dans un premier temps à fenêtrer sur les populations de cellules mononuclées, à partir d'un histogramme de morphologie. Dans un second temps, on réalise un double marquage : on caractérise dans cette population les cellules les plus granuleuses porteuses d'IgE en surface, c'est à dire les basophiles, parmi lesquels on détermine les activés (par le marquage CD63 ou CD203c).
Un protocole en triple marquage consiste à identifier la population des basophiles par un marquage CD45 (marquage leucocytaire) – anti IgE plutôt que l'identification morphologique. Certains auteurs utilisent le double marquage CD63/CD203c, ce dernier permettant de caractériser les basophiles (Valent 2004).

Expression des résultats

Pour chaque échantillon testé, en plus du test d'activation à proprement parler réalisé pour chaque dilution, des contrôles négatif et positif sont réalisés.
Le contrôle négatif consiste à réaliser le BAT avec les basophiles du patient en remplaçant la solution d'allergène par un tampon salin. Il permettra d'évaluer l'activation spontanée des basophiles (activation basale). Tous les échantillons présentant une activation basale trop importante seront écartés et rendus ininterprétables. Cette activation basale trop élevée peut probablement être reliée soit à des conditions prénanalytiques incorrectes, soit à la réalisation d'un TPO juste avant le prélèvement sanguin pour le TAB.

Un contrôle positif consiste à réaliser le BAT avec les basophiles du patient en remplaçant la solution d'allergène soit par une solution contenant un anticorps monoclonal ou polyclonal anti IgE ou par un anticorps anti FcεRI qui permettra le pontage des IgE de surface (mimant la fixation d'un allergène), soit par une solution de fMLP qui provoque une activation du basophile par un mécanisme non-IgE dépendant mais qui permet de vérifier la fonctionnalité cellulaire du basophile et la qualité analytique du test. Ce type de contrôle est particulièrement recommandé quand le TAB est utilisé pour suivre des allergies à certains médicaments (opiacés, produits de contraste iodés).

Actuellement il est préconisé d'utiliser un contrôle positif anti IgE. L'intérêt de ce contrôle est de mettre en évidence une population de patients « non répondeurs ». Cinq à dix pour cents des patients ont des basophiles qui n'expriment pas CD63 ou CD203c par absence de dégranulation. Ce défaut est lié à un défaut de conduction du signal d'activation par les tyrosine-kinases Syk et lyn, associées aux chaines b et g du récepteur FcεRI. La

phophorylation des kinases entraine une cascade biochimique aboutissant à la secrétion des principaux médiateurs des basophiles.

Expression des résultats

L'activation des basophiles est le plus souvent exprimée en pourcentage de basophiles activés, dépassant un niveau seuil (cut-off), donné soit par les fournisseurs de réactifs, soit au cours d'études spécifiques. Le plus souvent le cut-off est fixé à 15%. Selon les utilisateurs, il peut être fixé à 10% au-dessus de la valeur du témoin négatif ou à la valeur moyenne + 4SD, ou encore à partir d'une courbe ROC.

L'activation peut selon d'autres auteurs être exprimée en variation d'intensité moyenne de fluorescence (MFI). Le cut-off est exprimé en pourcentage de variation de fluorescence. Le cut-off est fixé à 10%.

Un index de stimulation (MFI stimul/MFI témoin négatif) peut être utilisé. Un SI supérieur à 2 indique une activation des basophiles (Valent 2004).

Enfin certains auteurs (Ebo 2005) corrigent le pourcentage de basophiles activés en soustrayant le taux de basophiles du témoin négatif (activation basale).

III. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'ALLERGIE

L'allergie alimentaire est définie comme une réaction immunitaire anormale à des molécules allergéniques présentes dans les aliments, entraînant des réactions allant du léger inconfort, à l'urticaire en passant par l'asthme jusqu'au choc anaphylactique (Nieuwenhuizen, 2005).

L'atopie est la tendance individuelle ou familiale à produire des IgE spécifiques, en réponse à des petites doses d'antigènes, naturellement présents dans l'environnement, habituellement protéiques, et à développer des symptômes typiques tels que l'asthme, la rhinoconjonctivite ou le syndrome eczéma-dermatite.

Actuellement les mécanismes immunologiques exacts au niveau du tractus intestinal et le site de sensibilisation aux allergènes alimentaires restent discutés. L'atopie est une maladie en rapport avec un déséquilibre de la balance Th1/Th2. L'hypersensibilité immédiate (hypersensibilité de type I) est un type de réaction pathologique provoquée par la libération de

médiateurs par les mastocytes qui correspond à la manifestation clinique de l'allergie après une phase biologique de sensibilisation.

Le tractus gastrointestinal représente le plus grand organe immunitaire de l'organisme humain avec 400 m² de surface et par conséquent le plus vaste site d'exposition aux antigènes pathogènes exogènes. Il est bordé d'une simple couche de cellules épithéliales dans laquelle sont présents de nombreux lymphocytes. Cette surface est en contact avec nombre de bactéries et de protéines alimentaires. Or seul un faible pourcentage de sujets développera une allergie alimentaire, témoignant d'un état de tolérance pour les non allergiques. Le parcours des protéines alimentaires dans le tractus digestif se décompose en plusieurs étapes avant que les cellules T puissent réagir et induire soit un état de tolérance soit une hypersensibilité alimentaire.

III.1. ABSORPTION ET PRESENTATION DE L'ALLERGENE (Chehade 2005, Untersmayr 2006).

La première muqueuse en contact avec les protéines alimentaires est celle de la cavité buccale. Une absorption effective de protéines intactes d'arachide a été mise en évidence récemment (Dirks 2005).

Les interactions des protéines alimentaires avec l'œsophage et la muqueuse gastrique sont peu connues. Les allergènes alimentaires ont été considérés comme des éléments importants dans la pathogénèse des œsophagites à éosinophiles. L'acidité gastrique pourrait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'allergie et un rôle promoteur de la tolérance (Chehade 2005). Après la digestion gastrique par l'acidité et la pepsine, des peptides et des acides aminés libres sont absorbés au niveau du duodénum et du jéjunum. La trypsine, la chymotrypsine et les procarboxypeptidases digèrent les peptides en acides aminés et oligopeptides qui seront ensuite hydrolysés par les peptidases de la bordure en brosse du duodénum. Ils pourront ensuite être absorbés par les entérocytes. Environ 50% de l'absorption des protéines se déroule dans le duodénum. Les oligopeptides de moins de 8 acides aminés ne réagissent pas avec les structures impliquées dans la reconnaissance des antigènes. Des protéines peuvent échapper ou résister à la digestion et passer sous forme intacte.

Chez les nouveau-nés, l'immaturité enzymatique facilite le passage de protéines intactes. Chez l'adulte, 2% des protéines ingérées sont absorbés sous une forme immunologiquement intacte.

Les protéines peuvent traverser la barrière épithéliale par transcytose et être prises en charge par les cellules dendritiques de la lamina propria. Les cellules dendritiques sont présentes également au niveau des plaques de Peyer (PP) et au niveau des ganglions mésentériques. Elles peuvent aussi s'intercaler entre les cellules épithéliales et capter directement l'antigène dans la lumière intestinale. Les cellules dendritiques ont un rôle majeur dans l'orientation de la balance Tolérance/Hypersensibilité. Leur rôle dépend du microenvironnement cytokinique et de l'expression de molécules de costimulation par ces cellules.

Les protéines peuvent aussi traverser la barrière épithéliale par capture par les cellules M qui recouvrent les plaques de Peyer. Les cellules M facilitent le transport des antigènes complexes. Elles jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigène en présentant les antigènes aux cellules T dans la plaque de Peyer ou dans le ganglion mésentérique. L'antigène peut aussi être délivré dans la région subépithéliale de la PP riche en cellules dendritiques qui digèrent l'antigène et le délivrent aux lymphocytes B. Le rôle des cellules M dans le développement de l'allergie alimentaire est aujourd'hui controversé (Untersmay 2006).

Enfin, certains antigènes solubles utilisent la voie épithéliale transcellulaire ou paracellulaire et sont au contact des cellules T ou des macrophages dans la lamina propria. Les cellules épithéliales peuvent jouer aussi un rôle de CPA. Elles expriment constitutivement des molécules du CMH sur leur membrane basolatérale et peuvent présenter un antigène aux lymphocytes T.

III.2. LA REACTION ALLERGIQUE AU NIVEAU CELLULAIRE

Depuis maintenant une vingtaine d'années, le mécanisme cellulaire reconnu dans le développement de la maladie allergique est le déséquilibre de la réponse immunitaire Th1/Th2, en faveur d'une réponse Th2. Récemment le rôle des lymphocytes T régulateurs dans l'état de tolérance a été étudié. L'expression du phénotype Th2 est dépendante de deux facteurs : une prédisposition génétique et des interactions avec les facteurs environnementaux.

III.2.1 Le déséquilibre de la balance Th1/Th2 (figure 1) (Romagnani , 2004 & 2006)

La reconnaissance de l'antigène par la cellule Th naïve, en présence d'IL-12 fixée sur son récepteur induit l'activation des facteurs de transcriptions STAT-4 et T-bet impliqués dans la polarisation Th1. STAT-4 et T-bet sont activés quand IL-12 est produite par les cellules

dendritiques, en association avec interféron γ (IFN-γ) produit par les cellules Natural killer (NK).

Au contraire, la polarisation Th2 résulte de l'activation des facteurs de transcription STAT-6, GATA-3 et c-maf. La fixation d'IL-4 à son récepteur IL-4R active STAT-6. Le proto-oncogène c-maf est exprimé spécifiquement par les cellules Th2 et il se lie près du promoteur de l'IL-4. Il est nécessaire à la forte production d'IL-4 mais ne peut pas initier la transcription d'IL-4. En revanche, GATA-3 est un facteur majeur de la différenciation Th2. Ce facteur de transcription inhibe la production d'IFN-γ, augmente la transactivation du promoteur de l'IL-4 et régule directement l'expression d'IL-5 et IL-13. Son rôle est donc global dans la différentiation Th2, la prolifération des cellules Th2 et l'inhibition de la différenciation Th1. (Zhu 2006).

Les cellules Th2 produisent des cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. Ces cytokines induisent la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B, le développement et le recrutement des éosinophiles, la production de mucus et la contraction des muscles lisses.

Les cellules Th1 sont caractérisées par la production d'IL-2, IFN-γ et TNF-β sans production d'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13.

III.2.2. Rôle des cellules régulatrices (Akdis 2005, Chehade 2005, Jutel 2006, Bacchetta 2005)

Différents types de cellules CD4+ régulatrices ont été décrits dans l'induction de la tolérance orale. Elles sont classées en trois groupes : les cellules Th3 et les cellules TR 1, cellules T régulatrices inductibles, générées par le système immun périphérique par les cellules dendritiques périphériques et les cellules CD4+CD25+, cellules régulatrices naturelles, dérivées du thymus, dont le mécanisme de régulation est inconnu.

Les proportions de cellules Th1, Th2 et T régulatrices sont variables entre les sujets sains et les sujets allergiques. Le ratio Tr1/Th2 détermine le développement de la réaction allergique : La population Tr1 est prépondérante chez le sujet sain alors que la population Th2 est majoritaire chez le sujet allergique.

Les cellules CD4+ régulatrices représentent moins de 0,1% des cellules CD4+ circulantes. Elles peuvent être caractérisées par leur profil cytokinique. Les cellules Th3 produisent essentiellement du TGF-β avec des taux variables d'IL-4 et d'IL-10. Le TGF-β joue un rôle important dans la tolérance orale. Des taux abaissés de TGF-β ont été retrouvés dans les

lymphocytes du tractus digestif de patients allergiques. En outre, il permet le switch pour la production d'IgA.

Les cellules Tr1 régulent la réponse immune via la sécrétion d'IL-10. L'IL-10 supprime les cellules effectrices Th2, la sécrétion des cytokiniques proinflammatoires des mastocytes et les fonctions et activités des éosinophiles. L'IL-10 supprime la production d'IL-5 par Th0 et Th2. L'IL-10 régule les isotypes des immunoglobulines, en supprimant la production des IgE totales et spécifiques et en induisant la production des IgG4 et IgA.

Les cellules CD4+CD25+ contrôlent l'homéostasie immunologique. Les cellules CD4+CD25+ sont définies par l'expression constitutive du récepteur à haute affinité de l'IL-2 (CD25). Elles sont caractérisées par une faible capacité de prolifération et une production d'IL-2. L'IL-2 est nécessaire à leur fonction suppressive. Ces cellules sont impliquées dans l'état de tolérance. L'immunosuppression est médiée par le TGF-β lié à la surface, par un mécanisme contact dépendant. De plus les cellules CD4+CD25+ expriment le facteur de transcription FOPXP3, qui bloque l'induction des cellules Th1 et Th2 **(Figure 2)**.

III.3. Hypersensibilité de type immédiat (hypersensibilité de type I)

Après la phase silencieuse biologique de sensibilisation, c'est-à-dire la phase de synthèse des IgEs, une réintroduction de l'allergène va déclencher une réaction clinique en quelques minutes, due à la libération de différents médiateurs.

Lors de la sensibilisation, les IgE spécifiques d'un allergène se lient aux récepteurs de Fc de haute affinité, spécifiques de la chaine lourde ε (récepteurs FcεRI) qui sont exprimés sur les mastocytes et les basophiles. Lorsque les mastocytes sensibilisés par les IgE sont exposés à une réintroduction de l'allergène, les cellules sont activées et secrètent les médiateurs par dégranulation. L'activation du mastocyte résulte de la liaison de l'allergène à au moins deux anticorps IgE sur les mastocytes. Les molécules de récepteurs s'agrègent, déclenchant des signaux biochimiques donc l'activation de PLA2 qui entrainera la formation de médiateurs néoformés, dérivés de l'acide arachidonique ; la signalisation biochimique permettra l'exocytose des médiateurs préformés dont le médiateur majeur, l'histamine et des protéases.

L'histamine provoque la dilatation des petits vaisseaux sanguins, augmente la perméabilité vasculaire et stimule la contraction transitoire des muscles lisses. Les protéases peuvent provoquer des lésions des tissus locaux.

Les métabolites de l'acide arachidonique comprennent les prostaglandines qui entrainent une dilatation vasculaire et les leucotriènes qui stimulent la contraction prolongée des muscles lisses.

III.4. FACTEURS IMPLIQUES DANS L'INDUCTION DE LA TOLERANCE ORALE

Plusieurs facteurs peuvent affecter ou influencer l'induction de la tolérance orale. Certains sont des facteurs relatifs à l'allergène (dose et nature), tandis que d'autres facteurs sont inhérents au patient (âge, génétique, flore intestinale) ou à son environnement (exposition aux virus et bactéries).

III.4.1. Génétique

Les gènes jouent un rôle dans l'apparition de l'allergie, puisqu'il est montré que le risque d'asthme ou d'allergie est plus important chez un membre d'une famille d'allergiques que dans la population générale. Cependant les phénotypes et à fortiori les génotypes sont très variables et non identifiés. Il a été montré que trois génotypes de locus des molécules CMH classe II ont été retrouvés plus fréquemment chez les sujets allergiques à l'arachide laissant supposer qu'un contrôle génétique peut intervenir en partie dans cette allergie (Howell, 1998). Cependant la relation de causalité reste à démontrer. (Chehade 2005).

L'interaction gène-environnement et gène-gène devra être considérée et déterminée sur l'expression d'un variant génétique donné. Certains facteurs peuvent contribuer à la modification d'expression des gènes, tels que l'exposition aux endotoxines, l'exposition aux particules de diesel, la fumée du tabac, l'exposition aux infections virales, le régime alimentaire et différents facteurs agissant in utero, lors de la grossesse (Steinke, 2008).

III.4.2. Facteurs de l'environnement (von Mutius 2007)

En 1989, Strachan et al (1989) suggèrent que des infections et des contacts proches avec des frères et sœurs préviennent l'apparition de l'allergie chez un enfant, établissant ainsi la théorie hygiéniste. Celle ci a ensuite été documentée et évaluée au travers de nombreuses études. Actuellement trois principes sous tendent l'hypothèse hygiéniste :

- Des infections virales ou bactériennes peuvent diminuer le risque de développement d'une pathologie allergique.

- Une exposition à des particules bactériennes environnementales, non invasives diminue le risque d'allergie.
- Ces deux types d'exposition peuvent induire une réponse immunitaire adaptative et innée, propre à chaque individu.

L'hypothèse hygiéniste correspond en fait à une interaction complexe de multiples facteurs.

- Les phénotypes de la maladie allergique (asthme) sont distingués : l'asthme transitoire du jeune enfant, associé à une insuffisance respiratoire et se manifestant au cours des infections virales, lié au tabagisme de la mère pendant la grossesse ; l'asthme de l'enfant associé à la présence d'IgE spécifiques d'allergènes alimentaires ou de pneumoallergènes ; l'asthme sans terrain atopique…
- Le moment de l'exposition est un facteur primordial. Des expositions dans l'enfance et l'adolescence mais aussi in utero influencent la maturation du système immunitaire.
- Le contexte génétique de l'individu : Il apparaît qu'un nombre variable d'altérations sur différents gènes à différents moments du développement contribuent à moduler les mécanismes conduisant au processus allergique.
- Le type d'exposition :
    - Les infections virales à VRS et rhinovirus ont été largement étudiées comme facteur étiologique de l'asthme de l'enfant. Il semble qu'il n'y ait pas d'association VRS/atopie. Les autres infections virales ont été étudiées et les résultats obtenus sont contradictoires quant au rôle dans la pathologie allergique.
    - Les infections bactériennes : Des études contradictoires discutent de l'influence des otites moyennes sur le développement de l'asthme et de l'allergie. En revanche plusieurs études s'accordent sur la relation inverse qui existe entre infections gastrointestinales et atopie, rhinite allergique et asthme.
    - Exposition à des particules bactériennes non viables : Il est établi que les enfants grandissant dans une ferme sont protégés contre l'asthme, le rhume des foins et les sensibilisations allergiques. Il n'est pas encore expliqué pourquoi cette exposition spécifique à la ferme est protectrice mais étables, greniers à foin et consommation de lait non pasteurisé sont des facteurs protecteurs. L'âge de l'exposition (y compris en prénatal) protège l'enfant de l'allergie. La composition de cet environnement a été étudiée : endotoxines de bactérie gram négatif, acide muramique bactérien, champignons.. Il est à noter pourtant que

le rôle de chacun de ces composés étudiés individuellement a été mis en évidence dans les processus d'asthme atopique et non atopique.

Actuellement cette théorie hygiéniste, pas encore éclaircie au niveau des mécanismes cellulaires, n'a pas d'implication thérapeutique, en particulier pour la prescription des antibiotiques et des vaccinations. La première approche pratique relevant de la théorie hygiéniste est l'introduction de probiotiques dans l'alimentation du jeune enfant comme traitement préventif de l'allergie.

III.4.3. Facteurs liés à l'antigène

- **La dose de l'allergène :**

La tolérance orale peut être divisée en deux formes : celle à haute dose, et celle à faible dose, chacune de ces formes étant dépendante de mécanismes différents. La tolérance orale en présence de forte dose d'allergène semble résulter d'une anergie des lymphocytes, alors que la tolérance orale observée en présence de faible quantité d'allergène résulte d'une activation des cellules T régulatrices et de la sécrétion des cytokines IL-10 et TGF-β (Chehade, 2005).

- **La forme de l'allergène :**

Les formes solubles de l'allergène sont plus tolérogéniques que les formes encapsulées, protégeant l'allergène de l'action de l'acidité gastrique et de la dégradation enzymatique. De même, une sensibilisation primaire par une voie extra intestinale (voie cutanée ou respiratoire) induit des taux d'IgE et d'histamine plus élevés.

IV. LES ALLERGENES

La caractérisation des allergènes alimentaires semble être une longue histoire dont nous ne connaissons que les premiers chapitres (Poulsen 2005).

IV.1. DEFINITIONS DES ALLERGENES

L'allergène n'existe pas dans la nature. Ce sont les conditions d'exposition qui font qu'une protéine banale se transforme en allergène chez certains individus. En outre aucune définition biochimique de l'allergène ne peut être donnée. Il n'a pas été formellement démontré l'existence d'une relation structure-fonction en ce qui concerne l'allergénicité. Il est d'un intérêt certain de classer les allergènes : d'une part au moment du diagnostic pour comprendre les réactivités associées ou inattendues et d'autre part au cours de la prise en charge du patient, pour estimer le risque clinique et décider des évictions à mettre en place.

La classification des allergènes s'appuie sur la classification des protéines, basée sur des motifs séquentiels d'acides aminés mais pas sur des critères immunologiques.

- **Allergène :**

Les allergènes sont des antigènes particuliers qui induisent une réaction allergique avec une synthèse d'IgE spécifiques, dans certaines conditions environnementales, associées à des facteurs génétiques individuels.

- **Trophallergène :**

Les allergènes alimentaires sont des trophallergènes. Ce sont des allergènes ingérés qui engendrent des réactions générales (choc anaphylactique) ou cutanées (urticaire).

- **Pneumallergène :**

Les allergènes inhalés sont les pneumallergènes. Ils sensibilisent par voie respiratoire et sont responsables de l'asthme et des rhinites allergiques.

- **Allergène majeur :**

Un allergène majeur est un allergène purifié contre lequel au moins 50% des patients testés présentent des IgE spécifiques et qui donne des tests cutanés immédiatement positifs, à une concentration très faible chez au moins 90% des sujets ayant la maladie allergique en relation avec cet allergène.

- Pan allergènes :

Ce sont des allergènes très répandus. Ils sont regroupés dans des familles caractéristiques d'une catégorie de produit, par exemple les parvalbumines de poisson. Ces allergènes présentent une forte allergénicité. Ce sont des familles souvent à l'origine d'association d'allergie.

- Epitopes :

Dans chaque protéine les domaines capables de se lier aux IgE sont nombreux et largement répartis sur toute la molécule. Il n'existe pas une région ou une structure unique qui serait responsable de l'allergénicité (Wal 2004). La structure tridimensionnelle de la protéine peut être une caractéristique importante de l'allergénicité. Mais il existe aussi de nombreux épitopes linéaires ou séquentiels dont l'immunoréactivité est due au seul enchaînement des acides aminés composant la structure primaire de la protéine.

Vila and al (2001) montrent que seuls les patients ayant une allergie persistante aux protéines de lait présentent des niveaux élevés d'IgE spécifiques, se liant aux épitopes linéaires. Cette observation suggère que l'initiation de la maladie dépend de la conformation de la protéine tandis que la réponse immune persistante dépend de plus petites unités protéiques. Les motifs structuraux sont fortement liés à l'induction des IgE. Les cellules T interagissent via leur récepteur avec de petits peptides tandis que la forme de la molécule est importante pour la reconnaissance par les lymphocytes B.

IV. 2. NOMENCLATURE DES ALLERGENES

Les allergènes purifiés sont nommés selon la nomenclature établie par l'organisation mondiale de la santé et les sociétés d'immunologie (Chapman 2007) à partir de deux révisions en 1986 et 1994.

Le nom de l'allergène est composé :

- des trois premières lettres du genre
- une lettre de l'espèce
- un nombre indiquant l'ordre chronologique de purification (ex : l'allergène du bouleau : Bet v 1).

La nomenclature recouvre les différentes formes moléculaires du même allergène : isoforme ou isoallergène (formes moléculaires multiples d'un même allergène qui portent une forte réactivité croisée).

L'isoforme ou isovariant fait référence à des variants d'un même allergène présentant plus de 90% d'homologie de séquence. Les isoformes sont repérées dans la nomenclature par deux nombres supplémentaires (ex : Bet v 1.0101).

IV. 3 STRUCTURE MOLECULAIRE DES ALLERGENES ALIMENTAIRES

IV. 3. 1. LES ALLERGENES PROTEIQUES D'ORIGINE VEGETALE

Le clonage moléculaire et la comparaison des séquences en acides aminés des allergènes aux différentes bases de données des protéines permettent de classer les allergènes dans différentes familles de protéines dont les fonctions sont connues. Plus de quarante structures tridimensionnelles d'allergènes ont été déterminées.
Les allergènes protéiques d'origine végétale ont des propriétés biologiques très variables, et seront classés dans des familles telles des enzymes, des protéines de transport, des protéines de réserve, des protéines de défense, des profilines, des protéines de structure… (Wal 2004)

Classification des protéines

Plusieurs critères peuvent être utilisés pour classer les protéines : leur composition chimique, leur rôle biologique dans l'organisme et leur solubilité.

En fonction de leur composition chimique, les protéines peuvent être réparties en deux groupes : les holoprotéines et les hétéroprotéines. Les holoprotéines ou protéines simples contiennent exclusivement des acides aminés. On les divise en protamines, histones, gluténines, prolamines, albumines, globulines et scléroprotéines. Les hétéroprotéines contiennent en plus des acides aminés une partie non protéique (le groupement prosthétique) qui joue un rôle dans la fonction de la protéine. En fonction du groupement prosthétique elles sont divisées en nucléoprotéines, lipoprotéines, glycoprotéines, phosphoprotéines, hémoproteines, flavoprotéines et métaloprotéines.

En fonction de leur rôle biologique dans l'organisme on distingue deux grandes classes : les protéines fibreuses et les protéines globulaires. Les protéines fibreuses sont trouvées dans les tissus et les éléments de structure. Elles accomplissent des tâches structurelles : collagène, kératine, fibroïne. Les protéines globulaires jouent un rôle dans le métabolisme. Ce sont les

enzymes, les hormones, les protéines de transport, les protéines de l'immunité, les protéines de stockage.

En fonction de leur solubilité on distingue les protéines solubles et les protéines insolubles.

Les fractions protéiques sont souvent désignées par leur coefficient de sédimentation (S) qui permet de les comparer aux protéines de réserves chimiquement proches des autres espèces.

Les protéines sont classiquement divisées en quatre fractions. La majeure partie est constituée des trois fractions protéiques solubles dans l'eau ou en présence de sels neutres ou dans des milieux légèrement acides ou faiblement alcalins. On distingue différentes fractions :

- la fraction 2S*1* ou albumine ;
- la fraction 7S regroupant les vicilines et convicilines ;
- la fraction 11S ou légumine.

Une quatrième classe mineure est constituée des protéines insolubles. Elle représente environ 15 % des protéines de la graine, mais elle n'est que très rarement prise en compte dans la littérature en raison de sa difficulté d'approche analytique.

En 1924, Osborne propose une première classification basée sur leurs solubilités respectives dans l'eau (albumines), solutions salines (globulines), mélanges hydro-alcooliques (prolamines) et dans des solutions d'acides ou alcalines (glutélines). Actuellement, prolamines et glutélines sont réunies sous le même terme de prolamines, et certains auteurs simplifient également cette liste en deux super-familles : Celle des prolamines (albumines, prolamines, glutélines) et celle des globulines.

La plupart des allergènes alimentaires d'origine végétale peuvent être regroupés dans quatre familles de protéines (tableau I): la superfamille des prolamines, la superfamille des cupines, la famille des profilines et la famille Bet v 1 (incluant la famille des protéines de défense, PR-10) (Radauer 2007).

La super famille des Prolamines

Ces protéines se caractérisent par un important polymorphisme génétique. Leur forte teneur en proline et en glutamine (30 à 70%), acides aminés présents sous forme de motifs répétés leur confère des structures secondaires en coudes β et en hélices poly L-Proline II. A l'inverse, les séquences non-répétées ont tendance à former des structures globulaires. Les

cystéines présentes permettent la formation de ponts disulfures intramoléculaires. Leur pI est proche de 8 et elles sont faiblement chargées. Leur séquence polypeptidique comprend des séquences conservées A, B et C (certainement issues de la triplication d'un domaine ancestral commun, et parfois délétés chez certains groupes) riches en cystéine ainsi que des séquences répétées, aux motifs variables riches en proline et glutamine (Radauer 2007). Ce squelette de huit cystéines conservé permet de classer ces protéines dans ce même groupe alors que les prolamines ont d'abord été identifiées par leurs caractéristiques biochimiques de solubilité. Certaines enfin subissent des protéolyses lors de leur maturation post-traductionnelle.

Les prolamines constituent le groupe principal des protéines de réserve des graines de céréales et des graminées. Elles représentent la famille de protéines allergéniques la plus importante sur le plan quantitatif. Quatre groupes de prolamines représentent des allergènes alimentaires : les prolamines, les albumines 2S trouvées dans les noix et les graines, alpha-amylase /inhibiteurs de la trypsine dans les graines de céréales, et les protéines non spécifiques de transfert des lipides retrouvées dans les fruits et légumes. Ces trois groupes ont seulement le squelette cystéine en commun sur le plan structural. En revanche, ils présentent des structures hélice alpha très similaires. Ces structures sont très stables à la chaleur et à la protéolyse (Radauer 2007).

- Albumines (2S)

Certaines ambiguïtés règnent quant à la définition de cette fraction et sa nature biochimique. En effet, sont classées comme albumines toutes les protéines de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau, ce qui rassemble des molécules très hétérogènes.

Ces protéines sont présentes chez les monocotylédones comme chez les dicotylédones. Elles se composent de deux chaînes polypeptidiques, clivées à partir d'une seule protéine après biosynthèse et reliées par deux ponts disulfures. Deux autres ponts disulfures sont présents sur la chaîne β. Leur structure secondaire comprend 50% d'hélices alpha et très peu de feuillets béta.

Les albumines sont riches en acide glutamique, en acide aspartique en lysine et en leucine mais pauvre en tryptophane. Elles ont un poids moléculaire compris entre 50 000 et 100 000 daltons et un point isoélectrique situé dans la zone acide. Les albumines sont solubles dans l'eau, coagulables par la chaleur.

Elles correspondent aux allergènes majeurs des noix et graines : noix du Brésil, graines de sésame, graines de moutarde. On y retrouve également l'allergène majeur de l'arachide Ara h 2.

-Les prolamines : Gliadines, Glutélines, hordénine

Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les acides et alcalins dilués. Les allergies aux prolamines ne sont pas très fréquentes et ont été plus largement étudiées pour le blé.

- ns LPT type 1 :

Les ns LPTs jouent un rôle important dans la défense de la plante contre les bactéries et les champignons. Elles sont largement retrouvées dans les fruits, les noix, les graines et les légumes. Elles représentent un groupe important d'allergènes presque exclusivement pour la population méditerranéenne (Breiteneder 2005).

- alpha amylase/ Inhibiteurs de la trypsine

Ces protéines confèrent à la plante un certain degré de résistance aux pesticides. On les retrouve dans le blé, le riz, l'orge…

La superfamille des cupines

Les cupines constituent une superfamille de protéines très variables correspondant à dix huit classes fonctionnelles différentes allant d'enzymes bactériens aux globulines, protéines de stockage (Dunwell 2004). Ces protéines sont caractérisées par une architecture commune en « barril » (cupa en latin) avec deux hélices béta correspondant à un domaine conservé. Différents sous groupes de cupines sont décrits sur la base du nombre de domaine cupine. On distingue les monocupines, les dicupines et les multicupines.

Les dicupines correspondent à deux groupes de protéines de stockage : les vicillines (globulines 7S) et les légumines (globulines 11S) parmi lesquelles on retrouve les allergènes majeurs de l'arachide, des fruits à coque et des allergènes de graines, comme celles du soja.

Malgré des structures hautement conservées dans la famille des cupines, il existe une faible homologie de séquence (35 à 45%) entre ces protéines, conduisant à une réactivité croisée limitée (Astwood 2002).

- Vicilines (globulines 7S)

Ce sont des protéines de stockage, produites dans les cotylédons. Elles apportent les nutriments nécessaires à la germination. Elles se retrouvent en moins grande quantité que les légumines.

Ce sont des homo-trimères de 150 à 190 kDa, chaque monomère ayant une masse de 40 à 80 kDa.

Les vicilines ne contiennent pas de cystéine et donc aucune liaison disulfure ne peut être établie entre les polypeptides constitutifs. La structure trimérique n'est donc stabilisée que par des liaisons de faible énergie. Au cours de leur maturation, les vicilines subissent une glycosylation, mais celle-ci n'intervient que sur quelques polypeptides constitutifs. Elles subissent des étapes de protéolyse. Certaines de ces vicillines sont résistantes aux procédés industriels et à la digestion, les rendant ainsi des candidates privilégiées à être des allergènes.. Seulement 27% d'homologie de séquence d'acides aminés sont retrouvés entre les vicillines de noix de cajou et d'arachide. Il s'agit donc d'épitopes conformationnels représentés par leur structure quaternaire caractéristique, oligomérique trimérique (Astwood 2002).

- Légumines (Globulines 11S)

Ce sont des protéines polymériques comportant six sous-unités αß. Chacune d'elle est constituée d'un polypeptide acide, d'une masse moléculaire d'environ 40 kD, et d'un polypeptide basique ß, d'environ 21kD, tous deux reliés par un pont disulfure. Les masses moléculaires globales des légumines de pois s'échelonnent de 380 à 410 kD. Différentes études convergent pour montrer qu'il s'agit d'une protéine très compacte, de forme globulaire, où les polypeptides de type α plus hydrophiles sont situés à l'extérieur et où les polypeptides ß constituent le cœur hydrophobe de la protéine.

Le modèle décrit pour les légumines est également conforme à leur mode de biosynthèse : les sous-unités α, ß sont synthétisées sous forme d'un pro-peptide unique. Ces derniers s'assemblent sous forme de trimères avant d'être transférés dans le réticulum endoplasmique. Enfin, après transfert dans les corpuscules protéiques, un ultime clivage des pro-peptides libère les polypeptides α et ß. Un tel assemblage implique la présence de domaines structuraux très conservés au sein des pro-peptides de légumines, tels que la zone de clivage post-traductionnel entre les polypeptides α et ß ou les cystéines impliquées dans la liaison disulfure qui les relie. À l'inverse, des zones très variables ont été mises en évidence sur les polypeptides α. Enfin, les légumines sont très variables en terme de composition en sous-unité αß : un total de 22 polypeptides α et 11 polypeptides ß ont été recensés. Ces molécules ne sont habituellement pas glycosylées, à l'exception de la 12S du lupin.

La superfamille Bet v 1

La synthèse de protéines de défense végétale (PrDV) fait partie des réponses biochimiques que les plantes ont développées pour lutter contre les ennemis naturels et contre les stress environnementaux (Malandain 2004).

Lors d'un stress biotique (organismes phytophages ou pathogènes) la cellule végétale répond par la sécrétion de nombreux composés dont les PrDV. Celles-ci peuvent être secrétées hors de la cellule pour combattre le pathogène : chitinases, protéines thaumatine-like. D'autres ont un rôle passif et sont préformées dans la plante comme les inhibiteurs d'enzymes ou des lectines. D'autres protéines de réserve (Albumines 2S ou vicillines) participent à l'action défensive lors de la germination.

Lors d'un stress abiotique (sécheresse, froid, salinité) de nombreux gènes sont activés et l'expression des protéines est complexe. Cependant certaines familles de PrDV comme les HSP ou heat shock protéines limitent les dégâts conformationels des protéines consécutifs au stress thermique. L'exposition de la plupart des organismes à des températures supra-optimales pendant des temps courts inhibe la synthèse de la plupart des protéines et induit la synthèse d'une famille de protéines de faible masse moléculaire appelées protéines de choc thermique (heat shock proteins, HSP). Elles sont classées en fonction de leur poids moléculaire : HSP 90, HSP70 et un groupe hétérogène. Une HSP 70 présente un degré de similitude structurelle très important (environ 70% d'identité) chez les plantes et les animaux. Leur rôle dans la cellule est mal connu. Elles pourraient empêcher la désorganisation et la dénaturation des protéines multimériques. (Hopkins 2003).

Selon la classification de Van Loon, les PrDV sont regroupées en deux catégories :

Les protéines dites PR ou pathogenesis-related, PR proteins :

Quatorze familles de PR-protéines sont ainsi décrites (Asensio 2004). Les protéines PR-10 contribueraient à améliorer la résistance des plantes au stress thermique. Ce sont des protéines acides, à localisation intracellulaire, généralement membres d'une famille multigénique et ubiquitaires à travers le règne végétal. Elles contiennent un motif hautement conservé, identifié comme un site de fixation de groupements phosphate. Même si la fonction biologique de ces protéines est encore mal définie, plusieurs indications semblent être favorables à l'hypothèse d'une activité RNAse.

L'importance des protéines PR-10 dans la pollinose au bouleau et la sensibilisation bouleau-pomme est bien décrite. L'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1 est une protéine PR-10.

Les protéines PR-10 regroupent à la fois des protéines de pathogénèse et des protéines allergènes. Différentes isoformes sont exprimées à forte concentration dans les pollens, les graines, les fruits et les légumes des Rosacées, Apiacées et Fabacées (Ordre des Fagales).

Les allergènes de type Bet v 1 sont instables à la température et à la digestion. Les symptômes sont le plus souvent localisés à la cavité orale (Breiteneder 2005).

⇨Les protéines PR-like

Prés d'une vingtaine de protéines PR-like ont été identifiées comme des allergénes responsables d'allergie alimentaire.

Les profilines (Radauer 2007)

Les profilines sont des protéines cytosoliques de 12 à 15 kDa présentes dans toutes les cellules eucaryotes et des virus. Elles jouent un rôle dans le maintien de la régulation du cytosquelette en se fixant à l'actine. Deux groupes de profilines très différents en séquence d'acides aminés sont distingués : les profilines des vertébrés et virus et les profilines d'invertébrés, des plantes et champignons. Leurs structures 3D sont en revanche très similaires. Les profilines sont retrouvées dans les plantes à fleur. Compte tenu de la conservation des séquences des profilines, les protéines allergéniques de ce groupe présentent une très grande réactivité croisée entre les pollens des mono et dicotylédones, les plantes alimentaires et *Hevea latex*. Aucune profiline de conifère n'est allergénique. Aucune profiline d'autre source (animale, virale) n'est allergénique.

La sensibilisation à la profiline est observée chez environ 20% des patients présentant une allergie aux pollens. Cette sensibilisation à la profiline est encore plus fréquente : elle est retrouvée chez 50% des patients présentant une allergie alimentaire à la banane, l'ananas, ou à la tomate (Pauli 2006).

La classification taxonomique des allergènes, reposant sur la parenté taxonomique a permis de mettre en évidence certaines co-sensibilisations alors que d'autres sensibilisations surviennent à partir de protéines de familles botaniques très diffréntes comme dans les syndromes bouleau-pomme, latex-fruit, armoise-céleri-épices. L'hypothèse qu'une même molécule

retrouvée dans différents allergènes puisse provoquer une sensibilisation multiple conduit à un autre type de classification des allergènes basée sur la notion de famille moléculaire, famille dont les protéines ont un même rôle physiologique.

Pour de nombreuses protéines la fonction physiologique est liée à la présence de glycosylations. Les résidus carbohydrates peuvent être immunogènes. Ce sont les CDD (cross reactive carbohydrate determinant). Les CDD se comportent comme des antigènes monovalents sucitant la production d'IgE mais ne déclenchant pas la dégranulation des mastocytes et des basophiles. La mise en évidence des CDD au sein des familles moléculaires a donc permis d'expliquer les discordances observées entre les prick-tests et les tests *in vitro* et d'expliquer les « polysensibilisations » observées *in vitro* non retrouvées en clinique.

SUPERFAMILLE DES PROLAMINES	**Albumines 2S**	**Ara h 2 (Arachide)** **Ara h 6 / Ara h 7** **Ber e 1 (Noix du Brésil)** **Bra j 1 (Moutarde)** **Ana o 3 (Noix de cajou)** **Jug r 1 (Noix** **Ses i ½ …..**
	Prolamines	**Alpha gliadine (Blé)** **Gluténine (Blé)** **Hordénine (Orge)** **……**
	Alpha amylase/inhibiteur de la trypsine	**Hor v 15 (orge)** **RAZ 14 (Riz).....**
	ns LPTs	**Pru p 3 (Pêche)** **ns LPT1 (orge)** **Zea m 14 (Maïs)** **Cor a 8 (Noisette)** **Jug r 3 (Noix)** **Mal d 3 (Pomme)….**
SUPERFAMILLE DES CUPINES	**Vicillines 7S**	**Ara h1 (arachide)** **Ses i 3 (Sésame)** **Ana o 1 (orge)……**
	Légumines (11S)	**Ses i 6 (sésame)** **Glycinine G1c (soja)** **Ara h 3 (arachide)……**
LES PROFILINES		**Ara h 5 (Arachide)** **Mal d 4 (pomme)** **Api g 4 (Céleri)** **Ana c 1 (Ananas)** **Bet v 2 (Bouleau)** **Cor a 2 (Noisette)** **Gly m 3 (Soja)**
SUPERFAMILLE Bet v 1 (PR-10 protéines)		**Bet v 1 (Bouleau)** **Mal d 1 (pomme)** **Pru c 1 (cerise)** **Gly m 4 (soja)** **Ara h 8 (Arachide)** **Api g 1 (céleri)** **Cor a 1.04 (Noisette)…..**

Tableau I : Les allergènes protéiques d'origine végétale (D'après Radauer 2007)

IV. 3. 2. LES ALLERGENES ALIMENTAIRES PROTEIQUES D'ORIGINE ANIMALE

Les allergènes protéiques d'origine animale appartiennent aux même classes de protéines que celles d'origine végétale.

L'ovalbumine et l'alpha-lactalbumine appartiennent à la classe des albumines. L'ovoglobuline et la béta-lactoglobuline appartiennent au groupe des globulines.

La caséine est une phosphoprotéine riche en lysine. Dans le lait elle se présente sous forme de phosphocaséinate de calcium et représente environ 80% de la matière protéique. La caséine est coagulable en milieu acide et par la présure.

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les vertébrés. Il se trouve dans les os, la peau, les tendons et les cartilages. La molécule contient trois longues chaînes polypeptidiques de mille acides aminés environ. Ces chaînes s'enroulent en une triple hélice régulière.

En solution aqueuse et sous l'action du chauffage le collagène se transforme en gélatine. La gélatine est soluble dans l'eau et donne une solution visqueuse.

Dans les produits de la mer, les tropomyosines des crustacés et des mollusques et les parvalbumines des poissons sont des allergènes importants (Chapman 2007).

IV.4. PEUT-ON PREDIRE L'ALLERGENICITE D'UNE PROTEINE ?

Actuellement seulement 2% des 9318 familles protéiques définies par la base des données Pfam sont des allergènes. Les familles protéiques sont classées en superfamille replaçant les protéines allergéniques dans leur contexte phylogénétique. Hormis la superfamille des prolamines, les allergènes des plantes sont retrouvés dans peu de membres de famille de leur superfamille (Breteneder 2008).

De nombreux allergènes des végétaux ont une structure tridimensionnelle globulaire compacte intégrant des ponts disulfure et des glycosylations qui confèrent à la protéine sa stabilité. Ces facteurs donnent aux protéines, des caractéristiques physico chimiques comme la résistance à la protéolyse, la résistance aux pH acides leur conférant une forte stabilité. Des sites de liaison présents sur la protéine augmentent la stabilité thermique et la résistance à la protéolyse. Les ponts disulfures inter et intra chaines limitent les perturbations par la chaleur

ou les agents chimiques, qui en outre sont réversibles. Les allergènes importants de la superfamille des prolamines ou des PR contiennent de nombreux ponts disulfures. La glycosylation stabilise la structure de la globuline 7S du pois et augmente sa résistance à la dénaturation chimique. L'interaction de certains allergènes avec les lipides peut modifier leur allergénicité. De même certaines protéines ont une capacité majorée à s'agréger ce qui augmente leur immunogénicité. L'ensemble de caractéristiques structurales suggère qu'une protéine pourrait être allergénique si elle possède de nombreux pont disulfure, des sites de liaison et des glycosylations.

Cependant bien d'autres allergènes ont été décrits ne présentant pas ces caractéristiques, puisque certains peptides conservent une propriété allergénique et qu'ils ne sont démasqués qu'après libération lors de la digestion enzymatique et de la protéolyse de la protéine.

La caractérisation de la structure moléculaire d'une protéine allergénique représente un élément capital pour améliorer les connaissances sur le mode de fonctionnement du système immunitaire qui conditionne les processus de sensibilisation de l'organisme. L'identification complète protéomique et génomique ont permis de révéler des homologies de structure entre des allergènes. Toutes les protéines d'une même famille ne sont pas des allergènes. Aucun consensus ne détermine un degré d'identité suffisant, requis pour prédire ou éliminer une réaction croisée clinique.

La FDA et l'OMS précisent que toutes nouvelles protéines introduites dans les récoltes doivent être comparées en termes de structure et homologie biochimique aux allergènes alimentaires connus.

Les dernières recommandations (*Codex alimentarius*) préconisent d'étudier l'allergénicité des protéines en réalisant trois types d'analyses:

- Analyse de la séquence protéique pour identifier une homologie globale avec des protéines allergisantes connues ou des épitopes.
- Etudier la fixation d'IgE spécifiques pour mettre en évidence une fixation sur d'autres protéines du même produit et des réactions croisées avec d'autres protéines.
- Mesure de la résistance à la protéolyse : étudier la résistance à la digestion pepsique car certains allergènes sont peu hydrolysés dans le tractus digestif.

Mais il n'en demeure pas moins réel qu'actuellement il n'existe pas une définition biochimique de l'allergène et que son immunoréactivité n'est pas prévisible (David 2002).

V. MODIFICATION DES ALLERGENES PAR LES PROCEDES INDUSTRIELS

Le processus de digestion des aliments joue un rôle essentiel dans le développement de l'allergie et dans la sévérité des symptômes puisque l'exposition des épitopes au niveau du système immunitaire est nécessaire à l'initiation de la réponse allergique bien qu'actuellement l'ensemble des mécanismes physiopathologiques n'est pas encore connu.

De même la quantité, la nature des épitopes dans les protéines, l'influence de la matrice alimentaire sont autant de paramètres qui peuvent influencer l'allergénicité et la sévérité des réactions cliniques. Cependant là encore, la corrélation entre ces différents paramètres et la réaction allergique n'est pas encore définie (Thomas 2007).

Les aliments et les ingrédients alimentaires existent sous différentes formes et sont soumis à une très grande variété de conditions lors des procédés industriels pour améliorer leurs qualités de goût, texture, apparence, odeur (Crevel 2001, 2005).

Le but de ces traitements industriels est d'améliorer leur conservation en supprimant ou inactivant les toxines et agents microbiens, d'améliorer leur digestibilité, d'extraire certains composés à partir de l'aliment initial.

Ces traitements physico-chimiques sont des procédés mécaniques, des procédés de séparation, purification, des procédés thermiques, biochimiques, des traitements sous haute pression, des traitements d'irradiation… Globalement ces méthodes peuvent être classées selon deux grands principes : les procédés utilisant la chaleur et les procédés n'utilisant pas la chaleur.

Les procédés thermiques peuvent utiliser la chaleur sèche ou humide. Cuire, griller, rôtir, dessécher, pasteuriser, stériliser, dénaturer sont autant de traitements qui peuvent modifier le pouvoir allergénique d'un aliment soit en altérant la conformation des épitopes, soit en provoquant l'agrégation des protéines entre elles, soit en entraînant les réactions des protéines avec d'autres composés de la matrice alimentaire. Toutes ces transformations pourront réduire voire annuler l'allergénicité des protéines. Certaines protéines sont thermostables, d'autres conservent leur structure rhéomorphique en protégeant les sites de fixation des IgE spécifiques.

Les traitements non thermiques peuvent aussi modifier le pouvoir allergénique des aliments. L'hydrolyse enzymatique est le procédé le plus efficace pour réduire l'allergénicité en altérant les épitopes séquentiels et conformationnels. La protéolyse touche à la fois la séquence

d’acides aminés, la structure secondaire au niveau des ponts disulfure mais aussi les modifications post traductionnelles

Depuis quelques années, les biotechnologies sont largement utilisées dans la production alimentaire. La production d’organismes génétiquement modifiés (OGM) est proposée pour améliorer la quantité et la qualité des aliments (Leherer 2005). Les risques allergiques des protéines produites peuvent être classés selon trois niveaux. Le risque le plus élevé est d’importer une protéine allergénique connue. Le risque intermédiaire est de modifier en l’amplifiant une allergénicité existante. Enfin, un risque est de voir une protéine devenir allergisante chez l’homme. A l’inverse, la génération de plantes transgéniques hypoallergéniques sont des axes futurs qui pourraient être mis à profit pour la fabrication de vaccins. (Moneret 2007).

Les biotechnologies dans l’industrie alimentaire permettent aussi la production de protéines recombinantes qui pourront le cas échéant supplémenter des aliments afin d’améliorer leur qualité nutritionnelle. Comme pour les protéines issues des OGM, le pouvoir allergénique des protéines recombinantes devra être testé car si elles présentent des séquences d’acides aminés connues, les modifications post traductionnelles, elles pourront être différentes de celles de l’état natif.

Enfin une autre approche des modifications liées aux procédés industriels consiste à étudier des molécules nouvellement introduites dans l’alimentation humaine, pour leurs propriétés fonctionnelles ou leurs qualités nutritionnelles.

V.1. ALLERGENICITE ET PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES

V.1.1. TRANSFORMATIONS PHYSICO CHIMIQUES DES PROTEINES

Outre leur qualité nutritionnelle (haute ou basse qualité nutritionnelle en fonction de la présence ou absence des neuf acides aminés essentiels), les protéines ont des propriétés fonctionnelles qui donnent aux aliments leurs qualités organoleptiques. Une propriété fonctionnelle d’un ingrédient alimentaire est définie comme une propriété qui influence l’utilité de cet ingrédient et qui contribue aux caractéristiques désirées de l’aliment. La solubilité, l’hydratation, la viscosité, la coagulation, la texturation, la formation de pâte, les propriétés émulsifiante et moussante sont autant de propriétés fonctionnelles mises à profit dans la fabrication des aliments. Ces propriétés dépendent et varient en fonction de l’environnement physico-chimique des protéines : pH, température, force ionique, agitation, présence d’enzymes…

DENATURATION DES PROTEINES

La structure des protéines est très sensible aux traitements physico-chimiques. De nombreux procédés peuvent conduire à la dénaturation des protéines qui affectent la structure secondaire, tertiaire et quaternaire. Les traitements physiques qui peuvent induire une dénaturation sont le chauffage, le refroidissement, les traitements mécaniques, la pression hydrostatique et l'irradiation. Les interactions avec certains produits chimiques peuvent également dénaturer les protéines : acides et bases, métaux et hautes concentrations salines, solvants organiques.

Au cours de la dénaturation des intermédiaires partiellement instables peuvent apparaître. Chaque modification de structure de la protéine native est appelée dénaturation. Elle peut être réversible ou irréversible.

Typiquement, la dénaturation se décompose en une perte de la structure secondaire à 55-70°C, puis en une rupture des ponts disulfure à 70-80°C. Entre 80 et 90°C, des réarrangements vont créer des nouvelles interactions moléculaires et de nouveaux ponts disulfures. Entre 90 et 100°C les protéines vont constituer des agrégats qui peuvent interagir pour former un réseau tridimensionnel (gel).

De même, l'action des acides et des alcools utilisés comme solvant entraîne le dépliage des chaînes.

DEGRADATION DES PROTEINES

Contrairement à la dénaturation qui n'affecte que les structures quaternaire, tertiaire et secondaire des protéines, la dégradation des protéines affecte la structure primaire des protéines et aboutit à la formation d'autres produits parfois indésirables. La dégradation des protéines peut être de nature chimique ou enzymatique.

Les dégradations chimiques des protéines les plus connues sont :

- La formation d'isopeptides : Il s'agit de la formation par chauffage de ponts intramoléculaires ou intermoléculaires entre les fonctions amine terminal de la lysine et acide terminal de la glutamine ou asparagine. Les conséquences de cette réaction sont la perte de digestibilité.

- La formation de lysinoalanine : Elle correspond à la formation par substitution de la fonction OH de la sérine ou SH de la cystéine par la fonction amine terminal de la lysine par chauffage

en milieu basique (blanc d'œuf cuit). La conséquence de cette réaction est la diminution de la valeur nutritive à cause de la formation d'aides aminés anormaux.

- La réaction de Maillard : Elle correspond à la réaction entre un sucre réducteur et un groupement aminé. Cette réaction est responsable de la production des odeurs, des arômes et des pigments caractéristiques des aliments cuits. Elle peut également donner naissance à des substances cancérigènes et réduire la valeur nutritionnelle des aliments. La réaction de Maillard comporte deux grandes étapes complexes : La synthèse de composés carbonylés très réactifs (furfurals, réductones) et la formation de polymères bruns, aussi appelés mélanoïdines, et de composés très volatils et odorants. (figure 3)

Les dégradations enzymatiques des protéines peuvent intervenir au cours des processus de dégradation biologique des aliments tel que la fermentation ou la putréfaction. Les plus importantes sont :

- La formation d'alcools supérieurs :

La dégradation des protéines en alcools supérieurs est un processus enzymatique qui intervient lors de la fermentation alcoolique des fruits, céréales.

- La formation des amines biogènes :

La formation des amines biogènes intervient lors de la dégradation microbienne des denrées riches en protéines (putréfaction des viandes/poissons, maturation des fromages, fermentations..). Cette réaction de décarboxylation des acides aminés est catalysée par des enzymes présentes chez certaines bactéries (*E. Coli, Enterococcus*..).

L'histamine provient de la décarboxylation de l'histidine par l'histidine-décarboxylase. L'histamine est aussi présente naturellement dans divers types d'aliments.

V.1.2. TRAITEMENT THERMIQUE ET ALLERGENICITE

L'impact de la température au cours d'un process industriel alimentaire sur l'allergénicité d'un aliment est complexe à étudier. Dans un même aliment des protéines allergéniques appartenant à des familles moléculaires différentes sont présentes et ne possèdent pas les mêmes propriétés de résistance à la protéolyse et à la température. Les études menées sur ces propriétés abordent le plus souvent un des allergènes mais rarement l'aliment dans son ensemble. L'exemple de l'arachide est informatif dans ce sens que les différents allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h3 appartiennent à la superfamille des cupines (vicillines pour Ara h 1 et légumines pour Ara h 3) et à la superfamille des prolamines (Albumines 2S pour Ara h 2)

et qu'ils présenteront des résistances variables à la température mais au total l'allergénicité ne sera pas modifiée voire sera augmentée.

1. Le chauffage réduit l'allergénicité :

La plus simple action sur l'allergénicité est la dénaturation des protéines par le chauffage. Les changements de structure observés n'affectent que les protéines dites globulaires c'est à dire ayant une structure secondaire, tertiaire et quaternaire (Sanchez 2003). Un certain nombre d'allergènes d'origine animale ou végétale sont reconnus labiles au chauffage. Les viandes fortement chauffées perdent leur allergénicité (Fiocchi 1998).

La plupart des fruits de la famille des Rosacées, la pomme de terre, la carotte, les légumes verts possèdent des allergènes thermolabiles. La labilité thermique de la patatine par exemple s'explique par son agrégation avec d'autres protéines de la pomme de terre plutôt que par sa propre dénaturation (Koppelman 2002).

C'est aussi le cas des protéines sPR-10 qui perdent leurs propriétés allergisantes après cuisson.

2. Le chauffage ne modifie pas l'allergénicité :

Certains allergènes sont thermostables ou partiellement stables à la chaleur. La stabilité thermique des allergènes dépend de l'équilibre entre le nombre d'épitopes séquentiels et conformationels (Sanchez 2003). Plus l'équilibre sera en faveur d'épitopes conformationnels, moins le traitement thermique aura d'effets sur l'allergène.

La chaleur peut avoir un effet partiel sur les graines de soja, les céréales, les fruits à coques et celui de tous leurs dérivés.

Des protéines comme le sLPT persistent après cuisson (Mandalain 2004). Les sLPT restent allergéniques dans les produits à base de pomme, traités thermiquement.

Sancho et al (2005) montrent qu'un traitement thermique moyen de 90°C pendant 20 minutes de Mal d 3 natif n'altère ni la capacité de fixation des IgEs, ni sa fonction biologique de libération de l'histamine. Ceci s'explique probablement par une dénaturation réversible. Au contraire un traitement thermique plus sévère (100°C pendant deux heures) provoque l'oxydation de ponts disulfure, affectant les épitopes conformationels et conduisant à une capacité diminuée de fixation des IgEs.

A 90°C, une faible glycation apparaît, indiquant que les cycles de températures utilisés pour la fabrication des jus de fruits (135-140°C pendant 2-5s) ne modifient pas Mal d 3.

A plus forte température, une glycation limitée est mise en évidence. Celle-ci semble protéger la capacité de fixation des IgE par Mal d 3, en stabilisant la conformation.
La structure quaternaire d'Ara h 1, structure trimérique stabilisée par des interactions hydrophobes, localisées principalement dans la zone des épitopes rend l'allergène stable à la chaleur même si la protéine est dénaturée et agrégée (Maluki 2000).

3. Le chauffage augmente l'allergénicité

La conséquence la plus remarquable d'un chauffage est l'augmentation possible de l'immunoréactivité de certains allergènes, voire la formation de néoallergènes (Sanchez 2003).
Pour de plus fortes températures (100-125°C) des transformations chimiques vont avoir lieu. Probablement la plus importante et la mieux décrite est la réaction de Maillard, résultant de la fixation d'un sucre réducteur sur le groupement aminé de la lysine. Un certain nombre de produits dérivés (AGEs), la carboxyméthyllysine (CML), le malondialdéhyde sont ainsi formés.
D'autres réactions chimiques covalentes, induites par le chauffage contribuent à la modification de l'antigénicité. Des réactions entre protéines et lipides oxydés, des oxydations directes par les radicaux libres, la désamination de l'asparagine peuvent conduire à la formation de nouvelles structures immunoréactives (Davis 2001).

L'arachide native grillée, et les allergènes Ara h 1 et Ara h 2 grillés augmentent l'immunorécativité des IgE par rapport aux mêmes produits crus ou bouillis (Hansen 2003, Mandoulet 2005). Kopper et al (2005) montrent qu'une augmentation du temps de grillage de l'arachide diminue la solubilité d'Ara h 1 par formation d'interactions entre les glycoprotéines formées au cours de la réaction de Maillard et par aggrégation des protéines par la chaleur. Ces agrégats soumis à l'hydrolyse enzymatique et au pH dans le tractus digestif libéreront des formes solubles plus grosses, plus immunogènes augmentant ainsi l'allergénicité de Ara h 1.
En chauffant un allergène recombinant Ara h 2 en présence de sucres réducteurs, Gruber et al (2005) montrent une augmentation de fixation des IgE et localisent un fort niveau de fixation des IgE sur les épitopes 6 et 7, site de glycation non enzymatique de Ara h 2.
La température de maturation et de salaison de l'arachide grillée modifie aussi la fixation des IgE. Une arachide maturée, grillée et salée à une température de salaison de 77°C fixe plus les IgE et une plus grande quantité d'AGEs est observée (Chung 2003).

Les différents exemples présentés ici montrent que le traitement thermique ne réduit pas l'allergénicité et ne peut donc pas être envisagé à l'échelle industrielle comme outil de préparation de produits hypoallergéniques. Ces différents travaux mettent en évidence l'importance de travailler à l'échelle moléculaire pour comprendre les mécanismes en jeu mais ils montrent aussi de façon encore plus marquée l'importance de travailler sur l'allergénicité de l'aliment dans sa globalité pour mieux apprécier l'effet d'un process.

V.1.3. TRAITEMENT NON THERMIQUE ET ALLERGENICITE

Deux procédés non thermiques peuvent modifier l'allergénicité des protéines : l'hydrolyse et la fermentation, deux procédés qui peuvent être utilisées soit à des fins diététiques soit afin d'obtenir des produits hypoallergéniques.

L'hydrolyse enzymatique ou acide est largement utilisée pour la préparation des formules infantiles à base de protéines de lait de vache ou de soja. Une activité allergénique des protéines résiduelles a été observée dans les formules issues d'une hydrolyse partielle ou extensive. Des résidus allergéniques ont été retrouvés dans les agrégats de caséine après traitement enzymatique. Seules les formules dont l'hydrolyse a été « poussée » et composées d'acides aminés perdent leur réactivité allergénique (Docéna 2002, Rosendal 2000). Plus récemment il a été montré que le traitement protéasique sous haute pression pouvait aussi supprimer totalement l'allergénicité des hydrolysats de protéines du lactosérum, permettant l'utilisation de ces ingrédients dans la formule infantiles hypoallergéniques (Penas 2006).

Burks (1992) montre une légère réduction de l'allergénicité des protéines de la farine de soja après traitement par les enzymes digestives (pepsine, trypsine, chymotrypsine, peptidases). La digestion par la pepsine et la chymotrypsine de la globuline 11S du soja permet d'obtenir un hydrolysat composé de neuf fractions, dont une composée d'un peptide de 20 kDa hautement immunoréactif (Lee 2007). Cette observation suggère que cette protéine demeure allergénique après ingestion et digestion.

De même, la résistance de Ara h 2 allergène majeur de l'arachide, à la digestion et aux conditions acides a été étudiée. La protéine Ara h 2, digérée par la pepsine, la trypsine ou la chymotrypsine produit un fragment protéique de 10 kDa, qui conserve l'allergénicité et peut être reconnu par les IgEs (Bannon 2003). En revanche, si la protéine native Ara h 2 est préalablement traitée pour réduire les ponts disulfures (formés par les huit cystéine), alors la protéolyse enzymatique est complète et aucun résidu allergénique demeure. Ce fragment de

10 kDa débute au niveau de l'acide aminé en position 23, il est composé de 90 acides aminés et inclut six des huit résidus cystéine.

Les hydrolysats de protéines de blé sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique pour leurs propriétés émulsifiantes et stabilisantes des émulsions. L'hydrolyse peut être obtenue par voie enzymatique ou par traitement acide. Il a été montré que les hydrolysats de protéines de blé obtenus par voie enzymatique contiennent des peptides de plus de 1050 Da, conservant une activité immunoréactive. Ces peptides ne sont pas retrouvés dans les hydrolysats obtenus par traitement acide (Akiyana 2006). L'allergénicité des hydrolysats apparait pour des poids moléculaires compris entre 3000 et 5000 Da.

La fermentation par *Lactobacillus* du lait entier ne modifie pas la fixation des IgEs par rapport à un lait non fermenté pasteurisé (Ehn 2005).

Les produits fermentés (miso, shoyu) dans lesquels les protéines sont totalement hydrolysées par les protéinases des microorganismes ne contiennent plus d'allergènes (Tsuji 1995).

La sauce de soja est un assaisonnement fermenté traditionnel de l'Asie, composé de soja, de blé et d'une forte concentration en sel. Les protéines de blé sont complètement dégradées par les enzymes bactériennes en acides aminés et peptides ayant perdu toute capacité de fixation des IgEs.

V.2. ALLERGENICITE DES NOUVEAUX INGREDIENTS ALIMENTAIRES

L'addition de nouveaux ingrédients dans les aliments peut être motivée au niveau industriel pour des raisons nutritionnelles ou fonctionnelles. Les ingrédients alimentaires ajoutés peuvent être des fibres alimentaires (prébiotiques), des substituts de graisse ou de sucres, des probiotiques ou encore des ingrédients protéiques voire des protéines recombinantes. Leur addition dans l'alimentation humaine est considérée comme bénéfique pour la santé par leurs caractéristiques nutritionnelles et fonctionnelles. Cependant les aliments formulés avec ces nouveaux composés peuvent aussi présenter une allergie nouvelle liée à la présence de cet ingrédient nouveau.

Les ingrédients protéiques sont très largement utilisés dans la fabrication industrielle des aliments. Les protéines peuvent être présentes de façon isolée, sous forme de concentrat ou d'isolat. Elles sont incorporées pour modifier la texture, l'apparence et la saveur. L'allergénicité de ces produits est due à la forte concentration des protéines habituellement retrouvées dans l'aliment à des concentrations bien plus faibles. La farine de lupin peut être mélangée à la farine de blé jusqu'à hauteur de 10%. Elle présente une réactivité croisée avec l'arachide notable.

Le gluten, la caséine du lait de vache, le lactose insuffisamment purifié et contenant des protéines de lait sont autant d'ingrédients protéiques présentant un risque allergénique.

V.3 ALLERGENICITE ET BIOTECHNOLOGIES : LES ALLERGENES RECOMBINANTS

L'utilisation des protéines recombinantes en allergologie pour le diagnostic et l'immunothérapie se justifie par la nécessité prégnante de standardiser les méthodes diagnostiques et les protocoles thérapeutiques. Cette démarche déjà bien initiée dans le cadre de l'allergie respiratoire se met en place rapidement dans le cadre de l'allergie alimentaire.

Un extrait allergénique est composé de différents allergènes dont l'allergène majeur (allergène reconnu par plus de 50% des patients) et d'autres molécules non allergéniques. La standardisation des extraits est difficile. En effet les matières premières d'origine naturelle peuvent présenter des compositions moléculaires hétérogènes et variables selon les lots de

fabrication, en fonction du lieu de production, de l'année de la récolte ou de la saison, de la pollution…En outre les procédures d'extraction et les conditions de conservation peuvent également influencer la qualité de l'extrait allergénique.
Les méthodes de standardisation passent donc par différentes étapes de dosage et caractérisation des allergènes majeurs, la détermination de l'activité biologique (immunoréactivité avec les sérums de patients allergiques) et la réalisation des tests cutanés en comparaison d'un extrait de référence.
Les préparations d'allergènes natifs purifiés représentent une étape importante dans la fabrication des outils du diagnostic allergologique. Ces allergènes purifiés permettent un diagnostic composé par composé ; les structures de la protéine native sont conservées ainsi que les isoformes et les modifications post traductionnelles. Mais comme pour les extraits allergéniques, la préparation de ces allergènes purifiés est délicate et soumise aux mêmes variations d'origine du produit natif, aux modifications liées aux méthodes de préparation et de purification, à la contamination possible par d'autres allergènes de la même source.

L'intérêt des allergènes recombinants semble donc majeur. Par rapport aux extraits allergéniques, les protéines recombinantes sont mieux caractérisées. Différentes protéines recombinantes peuvent être mélangées : la teneur exacte de chaque composé est connue, le mélange est dépourvu de molécules non allergéniques, d'autres molécules (adjuvant) peuvent être intégrées au mélange. La préparation est reproductible, standardisable et quantifiable.
Par rapport aux allergènes purifiés, les protéines recombinantes sont plus homogènes, plus reproductibles, elles ne comporteront pas de protéines d'origine animale et elles seront disponibles en plus grande quantité.

Les qualités chimiques incontestables des protéines recombinantes doivent être complétées par des qualités d'immunoréactivité. Ces dernières devront être validées dans le cadre de l'allergie alimentaire (Steckelbroeck, 2008).

Production et caractérisation d'une protéine recombinante

Production

Les protéines recombinantes sont des protéines produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. Le process biotechnologique adapté à la production d'une protéine recombinante s'appuie sur :

- l'emploi d'un vecteur d'expression (plasmide ou virus) jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protétine recherchée.
- L'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré.
- Une phase de production permettant de fabriquer la protéine souhaitée.
- Une phase de séparation et d'extraction de la protéine du milieu de culture suivie d'une purification.

Les systémes de production sont caractérisés par les couples vecteurs-hôte. Le hôtes les plus utilisés sont la bactérie *E.Coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules CHO (cellules ovaires du hamster).

- *E. Coli* est le premier hôte utilisé pour la fabrication de protéines recombinantes. Les avantages de cet hôte sont une génétique bien connue ; c'est une bactérie facile à cultiver. Les taux d'expression sont élevés. En revanche, la bactérie secrète mal les protéines et il est nécessaire de détruire la bactérie pour récupérer la protéine. En outre *E.Coli* n'effectue pas les modifications post traductionnelles des protéines (glycosylation, carboxylation..). Enfin E.Coli étant une entérobactérie, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'entotoxines dans les protéines purifiées.
- *Saccharomyces cerevisiae* : Cette levure possède un matériel génétique simple et ne présente aucune toxicité. Les taux d'expression des protéines sont bons. En outre la levure est capable de fabriquer des protéines complexes et de réaliser les modifications post traductionnelles. La levure ne secrète pas les protéines contenues dans le cytoplasme et il est nécessaire de détruire la cellule pour récupérer les protéines.
- Les cellules CHO : les cellules CHO se prêtent à la culture en bioréacteur. Elles peuvent synthétiser des protéines complexes de poids moléculaire élevé. Cependant leur rendement est faible, les cellules sont fragiles et leur culture coûteuse.

D'autres bacéries (*Bacillus subtilis, Streptomyces, Lactococcus lactis*) peuvent être utilisées. Elles possédent des capacités de secrétion supérieures à E.Coli mais leur génétique est moins connue et le niveau de production est inférieur à E.Coli. D'autres levures (*Pichia pastoris*) et champignons filamenteux peuvent aussi être utilisées. Ces cellules sont capables de secréter la protéine recombinante et d'effectuer les opérations post traductionnelles.

Des plantes transgéniques peuvent aussi être employées afin de transférer un gène dans le patrimoine génétique de la plante. La mise au point de plantes transgéniques à partir de végétaux comme le tabac, le colza, la pomme de terre permet de produire des protéines

recombinantes précieuses. Cependant, le rendement de ces systèmes est faible et l'extraction et la purification sont des étapes à améliorer.

Caractéristaion d'une protéine recombinante allergénique

Le projet CREATE (Van Ree, 2008) propose les bases de la caractérisation d'un matériel de référence composé d'allergènes recombinants et la validation des méthodes de quantification de ces produits allergéniques destinés au traitement. L'objectif du projet est d'obtenir des allergènes purifiés ou recombinants ayant une composition en allergène quantifiable et vérifiable. Les critères de caractérisation physico-chimiques, de réactivité immunologique et de stabilité pourraient être transposés et proposés aux produits diagnostiques afin de standardiser les méthodes diagnostiques et augmenter leur sensibilité.

Caractérisation physico-chimique :

Production et purification de l'allergène

Le système de production de l'allergène doit être identifié par le couple vecteur-hôte, permettant ainsi de connaître la présence éventuelle des modifications post traductionnelles. Les méthodes de purification (gel filtration, HPLC en phase inversée, chromatographie d'immuno-affinité..) seront appliquées soit sur le milieu de culture soit sur les inclusions cellulaires…

Identification de l'allergène

L'allergène recombinant doit posséder une composition en acides aminés et une séquence en acides aminés similaires à celle de la protéine native. Une analyse en acides aminés par méthode HPLC ou LCMS permettra de comparer la quantité de chaque acide aminé à celle de la protéine native et de mettre en évidence une éventuelle contamination. Un séquençage en acide aminé sera effectué et une analyse en MS/MS permettra d'obtenir la composition en isoformes des allergènes purifiés et de mettre en évidence les modifications post traductionnelles de type glycosylation, carbamylation, oxydation…

Pureté de l'allergène

La préparation allergénique doit posséder une pureté d'au moins 95%. Une électrophorèse SDS PAGE, avec une coloration argentique permettra une bonne évaluation de la pureté.

Homogénéité

Une préparation d'allergènes recombinants doit présenter une homogénéité complète en terme de poids moléculaire, qui peut être appréciée par une chromatographie d'exclusion. Des protéines recombinantes issues de *Pichia pastoris* peuvent aussi présenter des glycosylations

post traductionnelles pouvant générer une hétérogénéité de taille sur le profil chromatographique. En outre le tracé SDS PAGE pourra mettre en évidence cette hétérogénité.

Structure secondaire

Les protéines recombinantes doivent avoir une structure secondaire correcte. Elle peut être appréciée par dichroisme circulaire ou IRTF. Les spectres obtenus devront être comparables au spectre de la protéine native.

Immunoréactivité

L'immunoréactivité peut être évaluée par l'étude des IgE spécifiques qui doivent se fixer de la même façon sur les allergènes recombinants. Elle pourra être évaluée par le dosage d'IgEs, dot-blot, inhibition de RAST. L'activité biologique sera évaluée par la capacité des allergènes recombinants à activer les basophiles et à induire la libération d'histamine.

PARTIE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL
(Présentation des travaux)

PROCEDES INDUSTRIELS ET

ALLERGENICITE DES ALIMENTS

I. TRAITEMENT THERMIQUE ET ALLERGENICITE

Présentation des travaux (1): *Franck P, Moneret-Vautrin DA, Dousset B, Kanny G, Nabet P, Guénard_Bilbaut L, parisot L.* **THE ALLERGENICITY OF SOYBEAN-BASED PRODUCTS IS MODIFIED BY FOOD TECHNOLOGIES. Int Arch Allergy Immunol 2002; 128:212-219.**

CONTEXTE DE L'ETUDE

Les protéines de soja sont des composés majeurs de l'alimentation animale et sont de plus en plus présentes dans l'alimentation humaine (700 000 tonnes de soja consommées par an). Les graines de soja sont riches en lipides, dépourvues d'amidon, avec une teneur élevée en protéines (35-40 %). Les produits dérivés du soja, obtenus après traitement industriel seront utilisés dans la fabrication de produits enrichis en protéines végétales destinées à la consommation.

Le soja complet est utilisé pour produire : germe de soja, soja grillé, farine de soja, aliments traditionnels (miso, lait de soja, sauce, tofu), huile de soja (94 % de la consommation de soja), et ses produits dérivés (acides gras, lécithines…).

Le soja est utilisé comme additif dans différents produits : viande, produits crémiers, produits de boulangerie (jusqu'à 0.5% de la farine de boulangerie, 3 à 6% dans les pâtisseries), produits céréaliers comme suppléments protidiques, et laits infantiles.

Le soja ne peut pas être consommé s'il n'a pas été au préalable traité industriellement, car il contient des facteurs anti-nutritionnels tels que les inhibiteurs de la trypsine ou des lectines.
Des traitements thermiques adaptés inactivent ces facteurs.(figure 4)

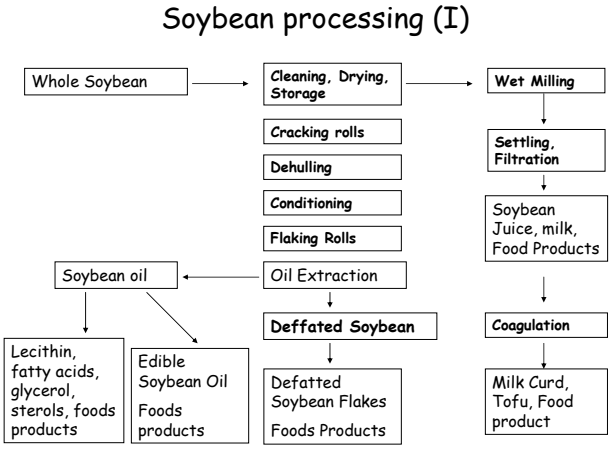


Figure 4 : Etapes du procédé de traitement des graines de soja

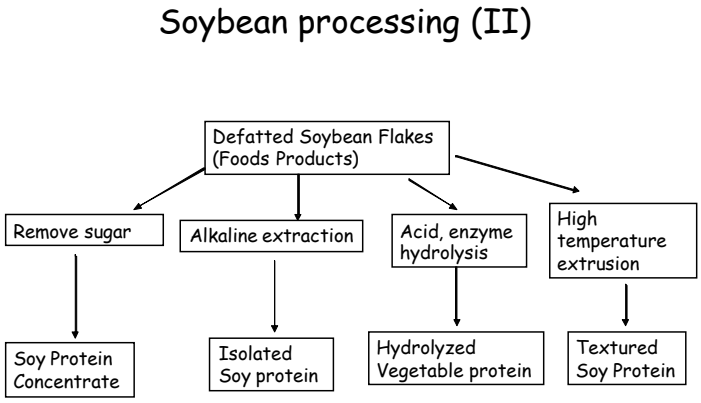


Figure 5 : Produits dérivés du soja obtenus à partir des flocons délipidés

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

L'allergie au soja varie selon la consommation en soja. Aux Etats-Unis, 14% des enfants allergiques au lait et 25% des enfants présentant une dermatite atopique par allergie alimentaire ont une allergie au soja. En Italie, 3% des enfants présentant une dermatite atopique par allergie alimentaire ont aussi une allergie au soja. Des cas mortels par choc anaphylactique ont été décrits.

Les protéines de soja sont consommées dans des aliments très différents par leur mode de préparation. L'allergénicité des protéines de soja a été étudiée dans différents produits. Elle est abolie par la fermentation. Lehrer (1997) ne met pas en évidence de différence d'allergénicité d'un soja transgénique à fort contenu en acide oléique par rapport au soja natif. Burks (1992) n'observe aucune modification de l'allergénicité des protéines de soja après traitement thermique (100°C pendant 20 minutes).

Notre étude a comparé, par méthode d'immunoblotting, l'allergénicité des protéines de soja dans des produits obtenus par différents procédés industriels : Farine de soja obtenue à partir des flocons blancs délipidés, lait de soja ou tonyu (obtenu par broyage des graines de soja), soja texturisé et deux laits infantiles dont un hydrolysat de protéines de soja. Un objectif secondaire était de mettre en évidence d'éventuels néoallergènes.

MATERIEL ET METHODES

Patients :

Neuf serums de patients ont été utilisés dont quatre provenant de patients ayant présenté des réactions allergiques majeures à différents produits dérivés du soja.

Extraits de soja :

Les produits testés sont : une farine de soja (Euronat® , France), un lait de soja (Sojasun®), un soja texturisé (Sojatop®) et deux formules infantiles : Lait de soja (Modilac soja®), et un hydrolysat de soja (Prégomine®).

Les protéines de la farine de soja et du soja texturisé ont été extraites dans un tampon NaCl-Tris, pH=8, contenant 2mM EDTA, 0,05% de deoxycholate après incubation d'une nuit sous agitation à +4°C. La suspension a été ensuite ultracentrifugée et filtrée. Le lait de soja a été dilué, les formules reconstituées. Puis les laits ont été extraits comme décrit précédemment.

Electrophorèse des protéines (SDS PAGE) :

Les électrophorèses de protéines ont été réalisées en conditions dénaturantes, sur gel de polyacrylamide. Les extraits sont chauffés à 100°C pendant 10 minutes dans une solution dénaturante (SDS 2,5% ; Mercaptoethanol 5% ; Glycérol 10%). L'électrophorèse est réalisée en gel polyacrylamide 10-15%. Un standard de poids moléculaire biotinylé est déposé sur la membrane.

Immunoblotting

Quand l'électrophorèse est terminée, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, puis la membrane est saturée par incubation dans un PBS, BSA 5%, Tween 0 ,05% pendant une heure. La membrane est ensuite mise en contact une nuit avec une dilution du sérum de patient dilué au 1/5 en solution BSA 1%, Tween 0,05%. Après lavages la membrane est incubée une heure à température ambiante dans un bain d'anticorps secondaire anti IgE humaines marqués à la peroxydase. La membrane est ensuite déposée sur l'analyseur d'images (Kodak Digital Science 1D) directement dans le luminol en présence d'H2O2. L'acquisition d'image dure 6,6 minutes (20 captures). Dans un second temps, une seconde acquisition est faite en présence d'avidine marquée à la peroxydase pour révéler le standard de poids moléculaire. Une membrane de contrôle est réalisée en parallèle : le sérum est remplacé par une solution BSA 1%.

Inhibition d'immunoblot

Le sérum est incubé une nuit en présence de 500µl d'extrait de la farine de soja afin de bloquer les IgEs. Puis un immunoblot est réalisé dans les conditions décrites précédemment.

RESULTATS

SDS PAGE

Les profils électrophorétiques des extraits protéiques obtenus à partir de ces différents échantillons montrent des compositions qualitatives proches pour le lait (Sojasun®) et la farine de soja avec des proportions variables pour les protéines de 33 et 37 kDa ; Des protéines de bas poids moléculaire (inférieur à 28 kDa) sont retrouvées dans le lait infantile. Aucune protéine n'est visualisée sur le profil électrophorétique de la Prégomine®. Dans le soja texturé une forte proportion de protéines de 31-34 kDa et 38 kDa est présente. On n'observe pas de protéines de haut poids moléculaire.(figure 6)

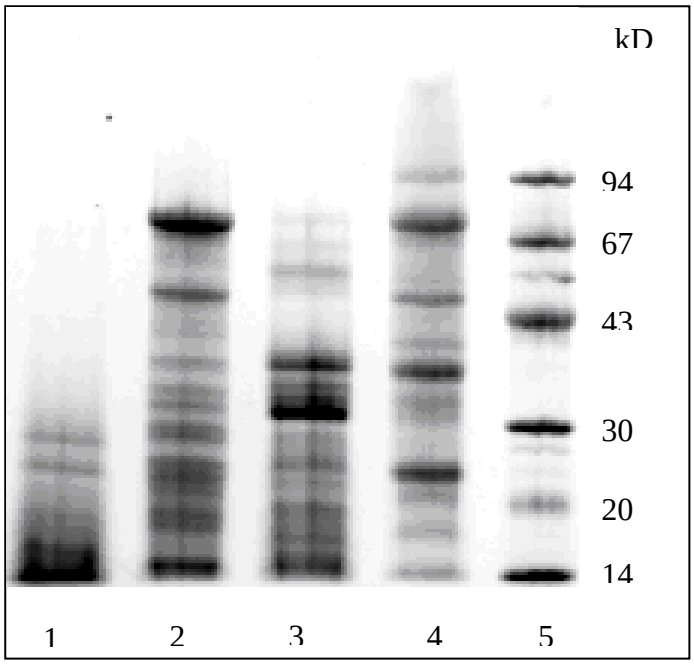


Figure 6 : Electrophorèse SDS PAGE des protéines de soja - Coloration au bleu de Coomassie. (1) Formule infantile ; (2) lait de soja ; (3) protéines de soja texturé ; (4) farine de soja ; (5) standard de poids moléculaire

Immunoblotting

Des protéines communes (33, 37, 49 kD) dans le lait et la farine fixent les IgE spécifiques des sérums de patients. Deux protéines (38 et 50 kD) du soja texturé fixent les IgE de sept sérums (figure 7). Aucune fixation d'IgE n'est observée avec le lait infantile

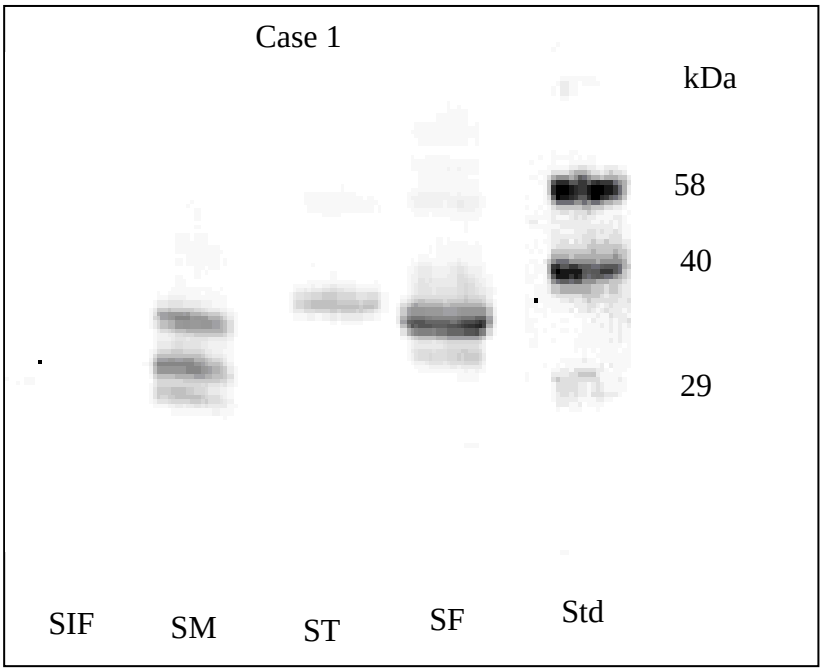


Figure 7 : Immunoblot réalisé avec le sérum du patient allergique au soja. SIF : Formule infantile ; SM : lait de soja ; ST : soja texturé ; SF : farine de soja ; Std : standard de poids moléculaire.

Le tableau II présente les poids moléculaires des protéines ayant fixé les IgEs des neufs serums dans les différents extraits de soja.

	Graines de soja	**Sojasun®**	**Soja texturé**
case 1	**33** -**37** - 49	24-**33**-**37**-**49**	38
case 2	**37**-**49**-**71**	**29**-**37**- (49)	**38**-**50**
case 3	31- (40)	**33**-37-41	(38) - (50)
case 4	-	-	**38** - 50
case 5	**49** -**71**	49-**59**-73	-
case 6	**49** - **71**	24 -**49** -59 -**73**	**50**
case 7	24- **33**-**37**- (49)	(24) - **33** - **37**	(18)-(27)- **38**
case 8	33 - **49**	29 - **49**	-
case 9	**49** - 55 - 73	**49** - **59**	**50**
gras: forte réponse; ( ) : faible réponse ; - : pas de réponse			

Tableau II : Immunoblot : Poids moléculaire (kDa) des protéines d'extraits de soja, détectées par fixation des IgE spécifiques.

Inhibition d'immunoblot

La préincubation du sérum avec la farine de soja inhibe complètement la fixation des IgE spécifiques des sera sur les protéines des graines de soja, du lait de soja et du soja texturé.

DISCUSSION

Les graines de soja sont très riches en protéines de réserve (37 à 41%) avec une proportion d'environ 90% de globulines et 10% d'albumine. Huit allergènes ont été décrits, appartenant aux différentes familles moléculaires des allergènes (Tableau III).

Allergen	Molecular weight (kDa)	Nature
Gly m 3	14	Profilin
20kDa-protein	20	G2 glycinin (basic chain) (11S)
21 kDa-protein	21	trypsin inhibitor (2S)
Gly m Bd 28K	28	
Gly m Bd 30K (major allergen)	30-34	Thiol protease
	40	G1 glycinin (acid chain) (11S)
	45	20 kDa Aggregates
	68-70	a subunit of b conglycinin (7S)
	7,12, 20, 39, 57	Proteic bands identified in soy lecithin.

Tableau III : Principaux allergènes du soja décrits dans la littérature

Le but de notre travail était d'identifier l'allergène responsable du choc anaphylactique d'un patient ayant consommé du soja texturé. Cette étude nous a permis de comparer l'effet des procédés industriels sur les protéines de soja.

L'extrusion des protéines consiste en un passage à travers une filière d'une farine de soja mise en solution alcaline. Le mélange est soumis à une forte température, à de fortes pressions et à des forces de cisaillement. Le produit final est poreux et fibreux. Les fibres pourront être utilisées pures, pour imiter des aliments naturels (analogues) ou en mélange avec les viandes (extenders) jusqu'à 45-50 % car elles conservent la masticabilité du produit final.

Les fibres ont des propriétés fonctionnelles meilleures que celles des protéines non traitées sans perdre leur qualité nutritionnelle (dépend du contenu, de la digestion et absorption des acides aminés.

Une haute température est nécessaire au cours du processus d'extrusion afin de dénaturer les protéines et de favoriser leur alignement dans le flux.

Les interactions protéines-protéines au cours de l'extrusion ne sont pas encore parfaitement connues. Il a été démontré la création de nouveaux ponts disulfure, de liaisons hydrophobiques non spécifiques, de nouvelles interactions électrostatiques (en proportions variables en fonction de la température) permettant la stabilisation de l'extrudat par insolubilisation et donnant au produit une résistance thermique très importante, de nouvelles liaisons peptidiques entre acides aminés libres et groupes carboxyle des protéines qui permettent l'agrégation des protéines dans l'extrudat. Enfin l'existence de réactions de Maillard a été montrée (Figure 8).

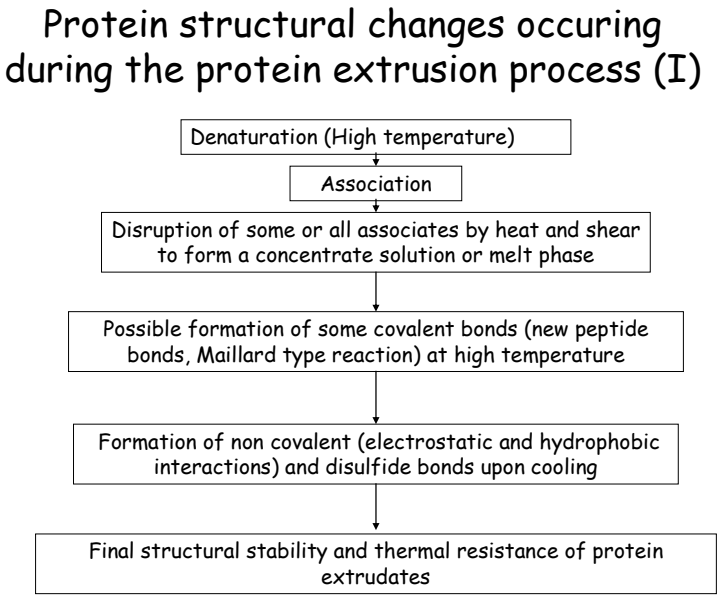


Figure 8: Modifications structurales au cours du procédé d'extrusion

Modification de l'allergénicité liée à la texturisation :

Les tracés électrophorétiques des extraits de soja montrent des différences importantes entre le soja texturé et le lait et la farine. Le lait de soja et la farine de soja montrent des profils similaires mais avec visiblement des proportions variables des différentes fractions protéiques présentes : une plus importante quantité de protéines de 33kDa dans le lait pour une concentration plus élevée en protéine de 37 kDa dans la farine. Pour le soja texturé le profil protéique est modifié laissant apparaitre une forte proportion de protéines de 31,34 et 38 kDa.

La texturisation ne fait pas apparaître de néoallergènes mais elle entraîne des modifications majeures de l'allergénicité du soja. Elle permet d'éliminer un des allergènes majeurs (Gly mBd 30K) ou le procédé de texturisation a pu modifier la structure de cet allergène. Elle conserve intacte l'allergénicité d'autres protéines.

Cette étude a été initiée à partir de l'observation du patient 1, ayant présenté un choc anaphylaxique au soja texturé. L'immunoblot réalisé avec le sérum de ce patient met en évidence une unique bande protéique de 38 kDa avec l'extrait de soja texturé et plusieurs bandes de 33,37 et 49 kDa dans les extraits de lait et farine.

L'allergène majeur Gly m Bd 30K est retrouvé dans les produits lait et farine de soja. Il est absent du soja texturé. En revanche l'allergène 38kD du soja texturé, décrit comme étant la chaîne acide de la glycinine G1 fixe les IgEs des sérums de cinq patients sur neufs testés.

La texturation pourrait permettre d'éliminer l'allergène majeur du soja. Cependant le traitement industriel semble « concentrer » le produit texturé en un allergène connu, la glycinine G1, globuline 11S, résistante par sa structure aux traitements thermiques. Le procédé industriel même s'il ne crée pas de nouveaux allergènes, même s'il détruit certains autres allergènes, peut conserver une allergénicité marquée.

Présentation des travaux (2) : *Franck P, Moneret-Vautrin DA, Fremont S., Morisset M, Kanny G.* **A PROPOS D'UN CAS : DROLE DE POULET !**

Les protéines de soja peuvent être incorporées aux aliments industriels en tant qu'ingrédients protéiques. La présence du soja n'est pas toujours lisible d'emblée. Dans ce cas l'interrogatoire clinique devient une véritable enquête !

OBSERVATION CLINIQUE :

Une femme âgée de 52 ans consulte pour une réaction systémique avec urticaire généralisée, un angiodème du visage, une gêne respiratoire et un épisode diarrhéique après ingestion d'un « suprême de volaille » d'origine industrielle.

L'interrogatoire signale une conjonctivite saisonnière par sensibilisation aux pollens de Bétulacées et Fagacées, une conjonctivite à l'épluchage de pommes et de pommes de terre. Aucune réaction n'est signalée après ingestion de poulet.

Le suprême de poulet est composé de 70% de protéines de soja, 30% de caséinate de calcium, de poudre d'oignons, d'un mélange d'épices et d'un arôme artificiel de poulet.

INVESTIGATIONS CLINIQUES :

Les pricks-tests sont positifs au soja blanc (2mm), au soja vert (8,5mm) et à la poudre de potage (2,5mm). Ils sont négatifs à la viande de poulet. Le test de provocation orale est négatif au soja vert jusqu'à la dose cumulée de 7g. Un TPO faiblement positif est observé quelques heures après ingestion de 40 ml de potage (prurit des paumes et du visage, discrètes douleurs abdominales).

Le RAST soja est négatif, le RAST Bet v 1 est à 41 KU/L.

Le test d'histaminolibération (HLL) est fortement positif au potage (33 à 38% d'histamine libérée à toutes les concentrations).

INVESTIGATIONS BIOLOGIQUES :

Différents extraits on été analysés par électrophorèse : Farine de soja, soja texturé, lait de soja et potage industriel.

L'électrophorèse des protéines a été effectuée en SDS PAGE, en conditions dénaturantes, et colorées au bleu de Coomassie (figure 9).

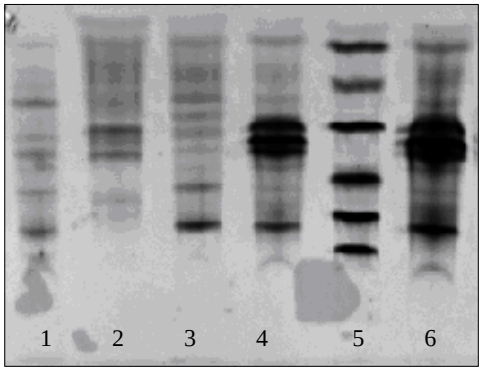


Figure 9 : Electrophorèse SDS PAGE d'extraits de produit dérivés du soja - Coloration au bleu de Coomassie. (1) : Farine de soja ; (2) Soja texturé ; (3) Lait de soja ; (4) « Suprême de poulet » ; (5) Standard de poids moléculaire ; (6) « Suprême de poulet ».

Les profils électrophorétiques des deux produits ayant subi un process industriel plus poussé (soja texturé et soja du potage) sont assez proches et mettent en évidence une plus forte concentration de protéines de poids moléculaires 30,34 et 37-38 kDa par rapport à la farine de soja. (Tableau IV).

Farine (kDa)	Texturé (kDa)	Lait (kDa)	Suprême (kDa)
14	14	14	14
	17		
	19	18	18
25	25	23	23
	30	28	**30**
33	**35**	32	**34**
37	**38**	37	**37**
41		42	42
53	57	49	50
79	65	73	73

Tableau IV : Poids moléculaires (kDa) des protéines des extraits de protéines de produits dérivés de soja.

L'immunoblotting réalisé en présence du sérum de la patiente montre la liaison des IgE spécifiques sur une protéine de 38kDa du soja texturé mais aucune liaison sur les protéines du potage (figure 10).

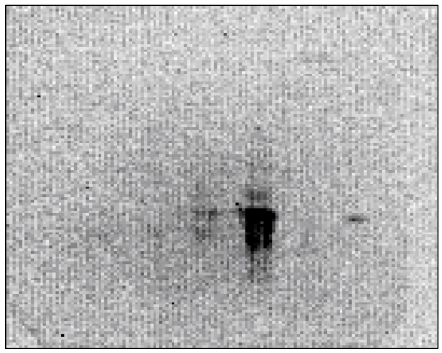


Figure 10 : Immunoblot réalisé avec le sérum de la patiente : Après transfert des protéines, la membrane est incubée avec le sérum dilué au 1/5.

DISCUSSION - CONCLUSION

Comme dans l'étude précédente concernant le soja texturé, l'allergénicité du soja dans cet aliment industriel est conservée. Les profils électrophorétiques montrent une incontestable modification des protéines présentes mais l'allergénicité du soja demeure. Cette étude révèle également la limite des tests diagnostiques : le test d'histamino- libération est positif alors que le RAST soja est négatif suggérant que l'allergène utilisé dans le test de dépistage des IgE est inadapté.

II. ALLERGENICITE DES NOUVEAUX INGREDIENTS ALIMENTAIRES

II.1. ALLERGENICITE DE L'INULINE

Présentation des travaux :*P. Franck, DA. Moneret -Vautrin, M. Morisset, G. Kanny, ML. Mégret-Gabeaux, JL Olivier.* **ANAPHYLACTIC REACTION TO INULIN: FIRST IDENTIFICATION OF SPECIFIC IgEs TO AN INULIN PROTEIN COMPOUND. Int Arch Allergy Immunol; 2004.**

CONTEXTE DE L'ETUDE

L'inuline est un hydrate de carbone présent dans plus de 36 000 plantes dont l'artichaut, la chicorée et les salsifis. Les fructanes alimentaires dont le chef de file est l'inuline constituent des prébiotiques couramment utilisés en nutrition humaine pour leurs caractéristiques nutritionnelles et fonctionnelles. Ces nutriments participent à l'équilibre de la flore bactérienne commensale et répondent à la définition de prébiotique : constituant alimentaire non digestible qui, dans la flore colique, stimule sélectivement un nombre limité de bactéries reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. De par leur configuration du carbone anomérique C2, les fructanes résistent à la digestion dans la partie haute du tractus gastrointestinal et ne sont pas absorbés. Ils sont alors considérés comme des « nutriments coliques », c'est-à-dire des composants de l'alimentation qui pénètrent inchangés dans le colon et sont utilisés comme substrat par les bactéries endogènes, favorisant la croissance des bifidobactéries.

Les fructo et galactoligosaccharides stimulent de façon sélective la prolifération des bifidobactéries et à moindre degré les lactobacilles (Macfarlane 2008), régulent la production fécale et augmentent l'absorption intestinale du calcium et du magnésium. Leur rôle dans la prévention du cancer a aussi été démontré.

Les fructo oligosaccharides sont retrouvés dans plus de 500 aliments sous forme de Raftiline et de Fibruline. Les produits laitiers sont de texture onctueuse et lisse. Une quantité minima de fibres alimentaires est incorporée dans les substituts de repas. L'inuline est utilisée aussi comme substitut de graisses dans les produits laitiers (fromage frais, mousse au chocolat), salés, carnés et les charcuteries allégées.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L’objectif de ce travail a été de mettre en évidence la présence d’IgE spécifiques dirigées contre l’inuline, composé non protéique.

MATERIEL ET METHODES

Patiente

Une patiente âgée de 50 ans a présenté un premier épisode d’urticaire généralisée après ingestion d’un biscuit diététique. Quelques mois plus tard elle présente un choc anaphylactique sévère avec perte de conscience après ingestion d’un yaourt F. diététique. Il est observé que les deux produits contiennent de l’inuline (Raftiline HP®) pour ses qualités bifidogènes. La patiente n’a pas d’histoire d’atopie mais elle a présenté plusieurs crises d’urticaire après ingestion d’artichaut. La consommation de produits laitiers est tolérée.

Investigations cliniques : Les pricks-tests sont négatifs aux 12 pneumallergènes courants et à 25 aliments testés en routine ainsi qu’aux aliments suivants : endive, laitue, lait, différentes viandes, épices, légumineuses, sésame, tomate, moutarde. En revanche les pricks –tests sont positifs aux artichauts cuits, au salsifis, au yaourt F. Le prick-test à la Raftiline est resté négatif.

Un test de provocation orale en double aveugle est réalisé avec une dose de 45 ml de yaourt F. (correspondant à 900 mg d’inuline). La patiente a présenté un érythème facial, puis un érythème des paumes avec prurit, puis un érythème généralisé avec urticaire, un prurit laryngé et une tachycardie sans chute de tension. Après traitement et éviction complète de l’aliment, plus aucune réaction ne s’est produite au cours du temps.

Investigations biologiques : Les IgE totales sont à 364 kU/l. Le RAST Broméline est négatif. Le test d’histaminolibération est négatif avec l’artichaut et très faiblement positif avec l’inuline. Les tests d’activation des lymphocytes et le test d’activation des basophiles sont négatifs après activation à l’inuline.

Extraits

Extraits d’artichaut : Différents extraits protéiques ont été réalisés à partir des artichauts cuits et crus, en prenant les feuilles ou les fonds d’artichauts. Une purée d’artichaut a été réalisée en broyant la base des feuilles dans de l’eau avec une cuisson de 20 minutes à 100°C.

Produits contenant de l’inuline (Raftiline®) : Différentes préparations contenant de l’inuline ont été testées : Yaourt F. contenant 2% de Raftiline, Lait de vache chauffé à 100°C pendant 10 minutes en présence de 2% de Raftiline, Solution aqueuse de BSA chauffée 15 minutes en présence de Raftiline (2,5%).

Chromatographie sur couche mince des sucres

La mise en évidence de la présence d'inuline a été réalisée par une technique de chromatographie couche mince (sur une plaque de silice) habituellement utilisée pour étudier les sucres de façon qualitative dans des milieux complexes. La coloration au 163 naphtoresorcinol permet d'identifier les sucres : les cétoses (fructose, saccharose) se colorent en rose, les aldoses (glucose, galactose, lactose) se colorent en bleu.

Dot Blot

La technique de Dot blot a été utilisée dans cette étude car l'allergène n'étant pas de nature protéique, il était impossible de pratiquer une électrophorèse suivie d'immunoblot. Pour mettre en évidence la présence d'IgE spécifiques dirigées contre l'inuline, les différents extraits ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci a ensuite été incubée en présence du sérum dilué 1/10 pendant une nuit à 4°C. Une membrane contrôle a été réalisée avec une incubation dans une solution de BSA1%. Puis les IgEs ont été révélées par fixation d'un anticorps secondaire anti-IgE humaines marqué à la peroxydase. La membrane est immergée dans le luminol en présence d'H2O2, directement sur l'analyseur d'images (Kodak Digital Science 1D).

RESULTATS

Chromatographie sur couche mince des sucres

La coloration au naphtorésorcinol a permis de mettre en évidence la présence d'inuline dans les différentes solutions protéiques contenant de l'inuline : le lait chauffé en présence de Raftiline, la solution aqueuse d'inuline, la solution d'artichaut, le yaourt F. En revanche dans le lait de vache et un yaourt Y ., aucune trace d'inuline n'est détectée (figure 11).

Dot blot

Le dot blot met en évidence la fixation des IgEs sur les échantillons contenant de l'inuline : Yaourt F., lait ou solution de BSA chauffée en présence de Raftiline, purée de feuilles d'artichaut. Aucune fixation d'IgEs n'est observée sur les membranes de contrôle (figure 12).

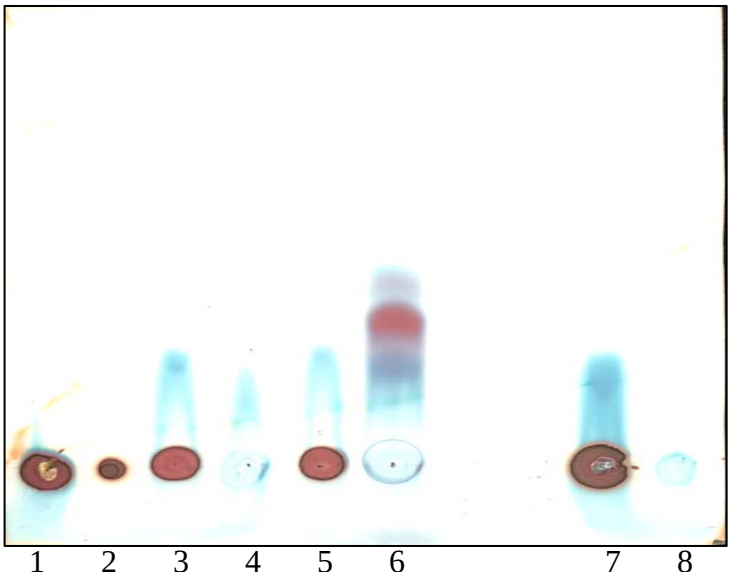


Figure 11 : Chromatographie sur couche mince des sucres (Révélation au naphtoresorcinol). L'inuline (oligofructoside) est repérée par une tache rose (cétose) qui ne migre pas, compte tenu de son haut poids moléculaire. (1) Lait de vache chauffé en présence d'inuline ; (2) : solution aqueuse d'inuline ; (3) Solution d'artichaut ; (4) Lait de vache ; (5) Yaourt F. ; (6) Yaourt Y. ; (7) Yaourt F. ; (8) Lait de vache.

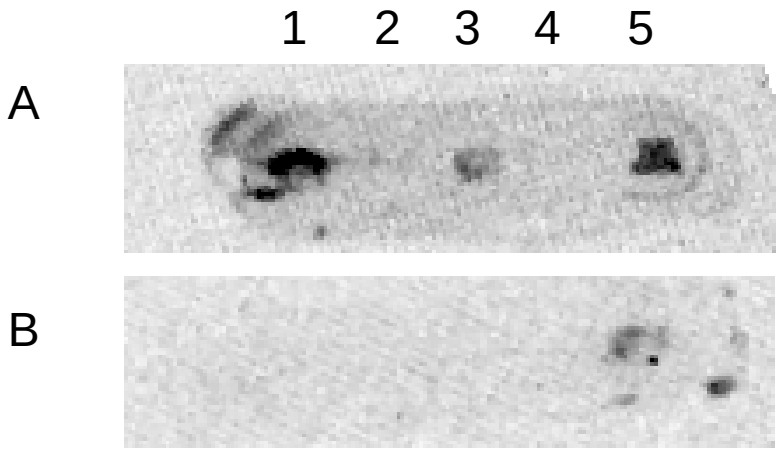


Figure 12 : Dot Blot : Les échantillons sont déposés sur la membrane qui est ensuite incubée en présence du sérum de la patiente les IgE spécifiques fixées sont mises en évidence par un anticorps secondaire parqué à la peroxydase. A) Membrane A réalisée en présence du sérum de la patiente : (1) yaourt F., (2) BSA ; (3) artichaut ; (4) BSA ; (5) BSA chauffée en présence

d’inuline. B) Membrane B réalisée en présence d’une solution de BSA : (1) Yaourt F. ; (2) BSA ; (3) artichaut ; (4) BSA ; (5) BSA chauffée en présence d’inuline.

Inhibition de dot blot

L’inhibition complète du dot-blot (par préincubation du sérum en présence d’une purée d’artichaut, du yaourt F. ou la solution de BSA-inuline) confirme la spécificité des IgE se fixant sur les échantillons contenant de l’inuline (figure 13). L’absence d’inhibition par la solution de Raftiline met en évidence l’incapacité de l’inuline à se fixer directement sur les IgE.

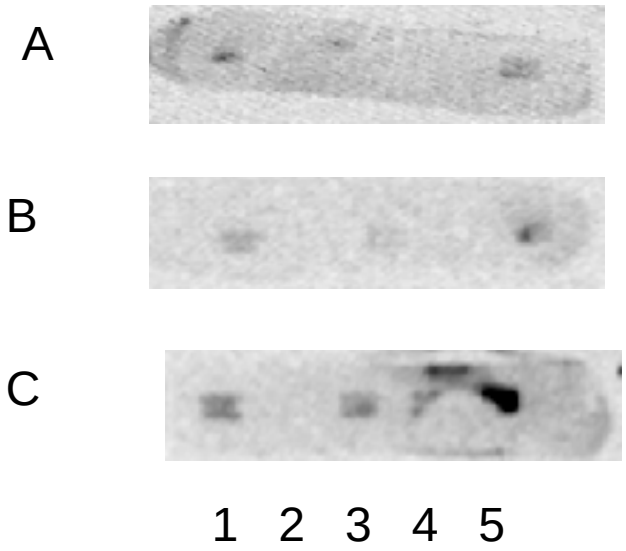


Figure 13 : Inhibition du dot blot : Le dot blot est réalisé avec le sérum du patient qui est inhibé par incubation préalable avec (A) Yaourt F. (B) la purée d’artichaut ; (C) la solution de Raftiline. (1) Yaourt F. ; (2) BSA ; (3) artichaut ; (4) BSA ; (5) BSA chauffée en présence d’inuline.

DISCUSSION

Plusieurs études ont montré au travers de différents cas cliniques l’existence d’une allergie à l’inuline. Gutierrez-Gomes et al (20005) présentent deux cas d’allergie à l’artichaut et à des produits contenant de l’inuline. Le diagnostic est posé à partir de l’histoire clinique et des résultats des prick-tetst. Dans une autre étude (Gay-Crosier, 2000), le diagnostic est posé après la réalisation de prick tests et de test de provocation orale en double aveugle positif dix minutes après ingestion de 10 g de Raftiline®.

Notre étude est la seule à avoir mis en évidence la présence d'IgE spécifiques dirigées contre l'inuline dans le sérum d'une femme ayant une histoire d'allergie à l'artichaut et ayant présenté deux épisodes de chocs anaphylactiques sévères à des produits contenant de l'inuline (biscuit de régime et yogourt). L'allergie à l'inuline a été objectivée par des tests cutanés positifs pour l'artichaut cuit, le salsifi et le yogourt F., un test de provocation orale en double aveugle positif à la dose de 2.5g de raftiline ingérée sous forme de yogourt F.

Les tests biologiques (dot blot et inhibition de dot blot) ont révélé la présence d'IgE spécifiques à l'inuline mises en évidence sur des complexes inuline-protéines obtenus après chauffage laissant suggérer que l'allergénicité de l'inuline est due au procédé de fabrication industrielle des produits incriminés. L'inhibition des dot-blots est un argument supplémentaire de la spécificité des IgE détectées.

II.2. ALLERGENICITE DES PROTEINES DE LIN

CONTEXTE DES ETUDES :

Le lin (*Linum usitatissimum* L.) fait partie du régime alimentaire des humains depuis des milliers d'années. Cependant un regain d'intérêt pour les graines de lin est apparu ces dernières années, classant le lin comme aliment fonctionnel.

Le lin oléagineux (à fibres courtes) est largement cultivé et ses principales utilisations ont été jusqu'à présent industrielles et agronomiques.

Au plan industriel le lin est utilisé dans la fabrication du linoleum et dans la production de peintures et teintures. La plante elle-même fournit des fibres à l'industrie des pâtes et papiers.

Le lin offre de nombreux avantages pour les animaux. Le lin ajouté aux rations des poules pondeuses permet d'obtenir des œufs ayant une teneur plus élevée en acide gras oméga-3. Le lin ajouté dans les aliments des chevaux rehausse l'apparence de la robe et du poil, améliore l'état des sabots et réduit la nervosité.

Chez l'homme, il s'agit d'un aliment nouveau à valeur nutritionnelle ajoutée en raison, en particulier de la richesse des graines de lin en acides gras omega-3 (acide alpha linolénique). Les lignanes, plus spécialement la podophyllotoxine, auraient un effet de prévention sur les cancers hormonodépendants (sein, endomètre) (Lamblin 2008) et un effet mélioratif sur l'hyperplasie bénigne de la prostate (Zhang, 2008) ; les fibres aident à réduire le taux de cholestérol total et la fraction LDL d'environ 7 à 10% chez les femmes ménopausées (Patade 2008), et à la digestion. Enfin les acides gras oméga-3 réduisent le risque de maladie cardiovasculaire (Bloedon, 2008) et d'accident vasculaire cérébral.

Le lin peut être consommé sous différentes formes : huile de lin, lin broyé, œufs oméga-3 ou à partir d'aliments enrichis en lin : pains, céréales, barres énergétiques, soupes, gaufres….. Enfin il est possible d'acheter directement du lin entier ou broyé qui pourra être incorporé à tout plat.

Une nette augmentation de la consommation du lin peut laisser penser en corollaire, à l'apparition d'une nouvelle allergie alimentaire.

Présentation des travaux (1) ***:*** *P. Franck, P. Chalmet , M. Morisset, D.A Moneret-Vautrin, JL Olivier, G. Kanny.* **ANAPHYLAXIS TO FLAXSEED.**

Soumis à JACI

CONTEXTE DE L'ETUDE

Le lin est largement consommé soit dans différents aliments dont le pain soit en tant que plante médicinale, en particulier pour ses vertus laxatives. Peu de travaux ont été publiés sur l'allergie au lin. Lezaun (2003) décrit un cas d'anaphylaxie après consommation de pain « multigraines » et identifie par immunoblotting des allergènes de haut poids moléculaire (150 kDA et100 kDa). Leon (2002) identifie à partir du sérum d'une patiente ayant consommé des graines de lin, un allergène majeur de 28 kDA qui pourrait être une malate déshydrogénase MDH-1 (Leon 2002).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'étude menée chez deux patientes ayant présenté un choc anaphylactique a pour objectif de caractériser les allergènes présents dans différents produits : la farine de graines de lin (obtenue à partir de graines de lin) et des protéines texturées de lin, qui seront incorporées à un pain « multigraines ».

En outre cette étude est la première à caractériser l'allergie par un test de provocation orale en double aveugle.

MATERIEL ET METHODES

Patients :

Patiente A : Une femme de 41 ans a consommé une préparation médicinale à base de graines de lin : Deux sachets de « Mucivital ® » (Arkopharma), correspondant à 13g de graines de lin. Quinze minutes après l'ingestion elle présente un œdème laryngé associé à une urticaire généralisée et des douleurs abdominales. Elle est traitée par adrénaline et prednisolone.

Son histoire est caractérisée par un asthme, une dermatite atopique et une pollinose. Elle présente une polysensibilisation à de multiples aéro-allergènes et allergènes alimentaires.

Patiente B :

Une femme de 34 ans, vendeuse en boulangerie, avec une expérience de rhinite et urticaire après consommation de pain spécial contenant du lin. Elle manipule quotidiennement des pains contenant du lin.
Elle a présenté un choc anaphylactique après consommation d'un pancake contenant du sarrasin.
Elle présente une allergie au sésame et à la noisette.

Prick -tests :

Les pricks tests ont été réalisés avec quatre produits différents : graines de lin broyées, farine de graines broyées obtenue à partir du produit Mucivital, protéines de lin maturé et de lin texturé obtenus auprès d'un industriel (Valorex). Le contrôle positif est réalisé avec la codéine (9%). Le contrôle négatif est réalisé avec un tampon salin. Le critère de positivité est un diamètre supérieur à 75% du diamètre contrôle.

Test de provocation orale

Il est réalisé uniquement chez la patiente A. La progression est menée jusqu'à une dose cumulée de 965 mg. Les doses sont incorporées à une compote de pommes et l'aliment placebo est du pain grillé émietté.

Dosage des IgEs

Les IgEs ont été dosées par la méthode immuno CAP (Pharmacia, Suède). Un taux supérieur à 0,3 kU/l a été considéré comme positif.

Extraits :

Les extraits de protéines ont été réalisés à partir de la farine de graines broyées obtenue à partir du produit Mucivital®, des protéines de lin maturé et des protéines de lin texturé.
Cinquante milligrammes des différents produits ont été mis en solution dans 5ml de tampon NaCl-Tris, pH=8, contenant 2mM EDTA, 0,05% de deoxycholate. Après incubation d'une nuit sous agitation à +4°C, la suspension a été ensuite ultracentrifugée et filtrée. Le taux de protéines est déterminé par une méthode au rouge de pyrogallol.

Electrophorèse des protéines (SDS PAGE) :

Les électrophorèses de protéines ont été réalisées en conditions dénaturantes, sur gel de polyacrylamide. Les extraits sont chauffés à 100°C pendant 10 minutes dans une solution

dénaturante (SDS 2,5% ; Mercaptoethanol 5% ; Glycérol 10%). L'électrophorèse est réalisée en gel polyacrylamide 10-15%. Un standard de poids moléculaire biotinylé est déposé sur la membrane.

Immunoblotting

Quand l'électrophorèse est terminée, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose, puis la membrane est saturée par incubation dans un PBS, BSA 5%, Tween 0 ,05% pendant une heure. La membrane est ensuite mise en contact une nuit avec une dilution du sérum de patient dilué au 1/5 en solution BSA 1%, Tween 0 ,05%. Après lavages la membrane est incubée une heure à température ambiante dans un bain d'anticorps secondaires anti-IgE humaines marqués à la peroxydase. La membrane est ensuite déposée sur l'analyseur d'images (Kodak Digital Science 1D) directement dans le luminol en présence d'H2O2. L'acquisition d'image dure 6,6 minutes (20 captures). Dans un second temps, une seconde acquisition est faite en présence d'avidine marquée à la peroxydase pour révéler le standard de poids moléculaire. Une membrane de contrôle est réalisée en parallèle : le sérum est remplacé par une solution BSA 1% afin de visualiser d'éventuelles fixations non spécifiques des anticorps secondaires. Deux sérums de sujets non allergiques ont aussi été testés comme contrôles négatifs.

RESULTATS

Investigations cliniques et biologiques

Patiente A

Les pricks-tests aux graines broyées, à la farine "Mucivital", aux protéines de lin mature et aux protéines de lin texture sont positifs.

Le TPO en double aveugle est positif à la dose de 265 mg avec apparition d'une urticaire généralisee et des douleurs abdominales.

Le taux d'IgEs est 0,51 kUI/l.

Patiente B

Le prick test aux graines broyées est positif.

Le taux d'IgEs est 1,7 kUI/l.

Electrophorèse SDS PAGE

Les profils électrophorétiques sont similaires pour les trois produits testés. Trois protéines de poids moléculaires 9, 23, 31 kDa sont observées (figure 14).

Immunoblotting

L'immunoblotting réalisé avec le sérum de la patiente A met en évidence la fixation des IgEs sur une protéine de 30kDa dans la farine de lin (figure 15). Aucune fixation d'IgEs n'est révélée chez la patiente B.

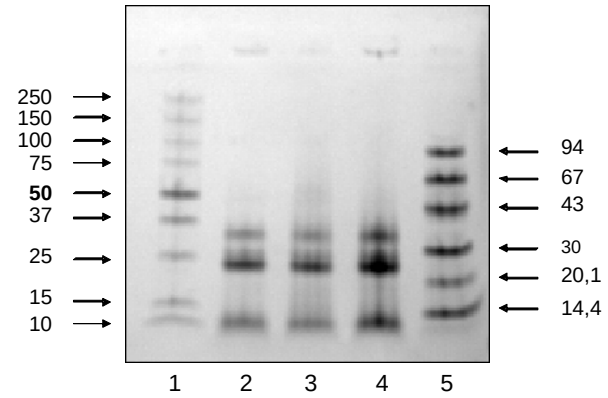


Figure 14 : SDS PAGE des extraits de lin – Coloration au bleu de Coomassie. (1-5) Standards de poids moléculaire ; (2) Farine de lin ; (3) Lin maturé ; (4) Lin texturé.

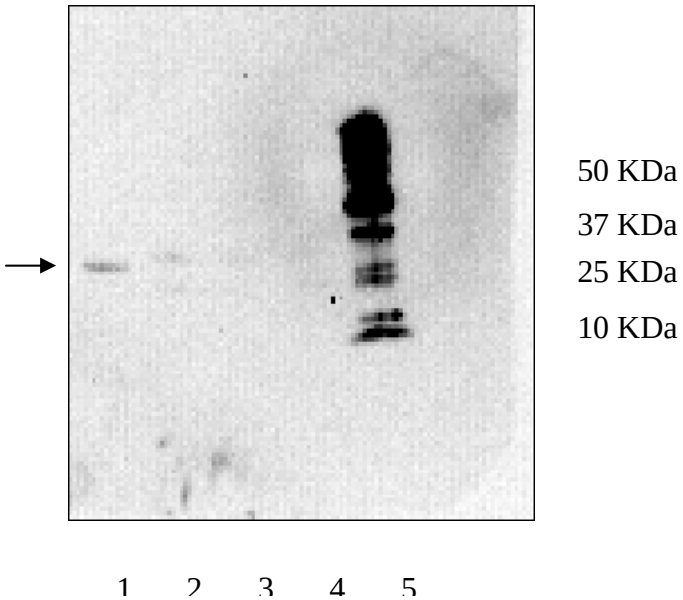


Figure 15 : Immunoblot réalisé avec le sérum de la patiente A : Après transfert des protéines, la membrane est incubée ave le sérum dilué au 1/5. la fixation des IgEs est révélée par un anticorps secondaire anti IgE humaine marqué à la peroxydase. (1) Farine de lin ; (2-3) Protéines maturées ; (4) Protéines texturées, (5) Standard de poids moléculaire.

DISCUSSION – CONCLUSION

Cette étude à partir de deux cas d'ingestion de lin dans deux produits différents, un laxatif et du pain confirment le risque allergique lié au lin. Peu d'études sur l'allergénicité des protéines de lin ont été publiées et ce travail est le premier à explorer les variations d'allergénicité liées aux procédés industriels tels que la maturation et la texturation. Les profils électrophorétiques ne mettent pas en évidence de différences majeures entre les produits industriels et les graines de lin.

Une protéine de 30kDa dans la farine de lin obtenue à partir des graines de lin, a fixé les IgEs. Cet allergène a été retrouvé dans d'autres études (Leon 2002, Lezaun 1998), et identifié comme étant un monomère d'une malate déshydrogénase, enzyme dimérique.

En revanche les protéines maturées et texturées n'ont pas fixé les IgEs laissant supposer une altération de l'allergénicité par les procédés industriels. Cette modification devra être confirmée sur d'autres échantillons de patients.

Présentation des travaux (2) *: S. Fremont , D.A. Moneret-Vautrin, P Franck, M. Morisset, A. Croizier, F. Codreanu, G. Kanny.* **PROSPECTIVE STUDY OF SENSITIZATION AND FOOD ALLERGY TO FLAXSEED IN 1,317 SUBJECTS.**

Soumis à

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Certaines farines contenant du lin peuvent être utilisées pour la fabrication de « pain au lin ». Ainsi, le produit VALOREX est un mélange de graines de lin de huit variétés, broyées (40%) et de farine de blé (60%). Les graines de lin sont d'abord maturées (soumises après broyage à une vapeur à la température de 80 à 100°C pendant environ 20 minutes) puis la pâte obtenue est soumise à extrusion (passage dans une vis sans fin, soumises à de multiples forces de cisaillement, sous pression et à une température de 135°C). Ce mélange contient 80% de protéines, 16% de lipides. En conséquence un certain nombre de questions peuvent être posées concernant l'allergénicité des graines de lin et la recherche d'une éventuelle modification de l'allergénicité des protéines de lin par la technologie de fabrication du produit Valorex. En effet celle-ci induit des modifications conformationnelles des protéines pouvant retentir sur l'allergénicité . La recherche d'une éventuelle modification de l'allergénicité des protéines de farine de blé par la technologie de fabrication du produit Valorex devrait aussi être étudiée. Ceci parait extrêmement important eu égard à l'augmentation de fréquence des allergies alimentaires à la farine de blé, et au risque de néo-allergénicité déjà démontré pour les isolats de protéines de blé. L'existence de réactions croisées des protéines de lin avec les principaux pollens et les allergènes alimentaires d'origine végétale pourra être étudiée par prick tests reflétant la sensibilisation croisée éventuelle, plus proche du risque allergique que l'étude de la réactivité croisée in vitro.

L'objectif primaire de cette étude est de préciser la prévalence de la sensibilisation et de l'allergie à la farine de lin chez 1317 patients consultant pour des affections allergologiques diverses. Les objectifs secondaires sont l'étude des réactivités croisées du lin avec d'autres graines (soja, lupin, colza) et la comparaison de la sensibilisation aux graines de lin naturelles avec les protéines de lin maturé et de lin texturé.

MATERIEL ET METHODES

Patients :

L'étude prospective a été menée sur 18 mois chez 1317 patients consultant en allergologie pour motifs divers. Ils subissent un interrogatoire systématique recherchant une possible allergie alimentaire au lin, et un bilan par prick tests à 12 aéroallergènes s'ils présentent rhinite ou/et asthme, et à 12 aéroallergènes et 26 trophallergènes courants, s'ils sont suspects d'allergie alimentaire. Un prick in prick à un broyat de graines de lin est systématiquement ajouté avec leur consentement éclairé. Ils sont classés en deux groupes.

Le groupe de 713 sujets avec maladie atopique inclut des patients porteurs de dermatite atopique, d'allergie alimentaire, de rhinite allergique ou d'asthme allergique, documentés par des prick-tests positifs à au moins un Pneumallergène de référence ou un Trophallergène courant. Dans ce groupe, un sujet (case 1) sensibilisé aux protéines de lin (RAST lin : 8,5 kU /L) a fait l'objet d'une étude par western blot. Le groupe des 603 sujets non atopiques comporte des patients consultant pour allergie aux Hyménoptères, réactions adverses aux médicaments ou rhinite non allergique, sans antécédents de maladie atopique et dont les prick- tests sont négatifs à 12 aéro-allergènes courants.

Prick tests

La réactivité de la peau est appréciée par un Prick test à la Codéine 9 %. Le contrôle négatif est assuré par un test au sérum salin. Les 12 Pneumallergènes couramment testés sont les extraits Allerbio (Allerbio, Varennes en Argonne, France) : *D.Pteronyssinus*, blatte, *Alternaria*, epithelia de chat et chien, latex, pollens de Graminées, bouleau, armoise, plantain, frêne, colza. 26 Trophallergènes courants sont testés par prick in prick (Dreborg, 1991) : lait, œuf, poisson, farine de blé, seigle, levure de boulanger, arachide, soja, sésame, sarrasin, crevette, crabe, amande, noisette, noix, petit pois, banane, bœuf, poulet, porc, maïs, ail, oignon, moutarde, pomme de terre, tomate.

Dosage des IgE spécifiques

Les IgE spécifiques ont été dosées sur un système Cap system (Pharmacia, Uppsala, Suède). Les tests ont été pratiqués sur le reliquat de sérums prélevés pour diagnostic, chez 26 sujets ayant un prick-test positif.

Extraits protéiques :

Les produits testés sont : Des graines de lin, du lin (*Linum usitatissimum*) maturé (Valorex), du lin extrudé (Valorex) ainsi qu'une série d'autres graines : soja, arachide, lupin, blé…

Les protéines sont extraites après broyage des graines dans un tampon NaCl-Tris, pH=8, (contenant 2mM EDTA, 0,05% de desoxycholate, 0,05% Triton, 0,1% Nonidet) après incubation d'une nuit sous agitation à +4°C. La suspension a été ensuite ultracentrifugée et filtrée. Les dosages de protéines sont réalisés par une méthode au rouge de pyrogallol.

Electrophorèse des protéines de lin

Une électrophorése SDS PAGE en gel 8-25% est réalisée selon la méthode décrite précédemment en conditions dénaturantes (Phastsystem, Pharmacia).

Immunoblot

Un immunoblot est réalisé selon la méthode décrite précédemment.

Inhibition d'immunoblot

Le sérum testé (500µl) est incubé une nuit à +4°C en présence d'un extrait d'arachide. L'immunoblot est ensuite réalisé en présence du sérum préincubé.

Analyse des produits natifs par spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier

Les différentes poudres sont pastillées en KBr et analysées en IRTF (Mattson, Unicam). Vingt scans sont réalisés pour chaque analyse. L'étude des structures protéiques est réalisée par l'analyse en dérivée seconde sur les domaines 1720-1600, 1600-1500, 1350-1200 cm-1 correspondant respectivement aux domaines d'absorption des fonctions amide primaire, secondaire et tertiaire des protéines.

RESULTATS ET DISCUSSION

Données cliniques

Prévalence de la sensibilisation

Le Prick-test aux graines de lin a été pratiqué chez 714 patients avec allergie alimentaire ou allergie respiratoire (360 enfants de moins de quinze ans, 354 adultes) et chez 603 patients non atopiques (213 enfants, 390 adultes). La prévalence de la sensibilisation au lin est de 12.2% chez les enfants atopiques, 8,2% chez les adultes atopiques. Elle est inexistante chez l'enfant non atopique, faible chez l'adulte non atopique : 1% (tableau V). La prévalence globale de la sensibilisation aux graines de lin, dans cette population est de 5,4%.

TableauV : Sensibilisation à la graine de lin explorée par Prick in prick

	Non atopiques		Maladies atopiques évolutives		**Total**	
	n	sensibilisés	n	sensibilisés	n	sensibilisés
Enfants	213	0 (0%)	360	44 (12,20%)		
Adultes	390	4 (1,02%)	354	29 (8,2%)		
Total	**603**	**4 (0,66%)**	**714**	**73 (10,2%)**	**1317**	**77 (5,84%)**

Fréquence de l'allergie au lin

Parmi les 77 sujets sensibilisés au lin, 73 sont atopiques. Deux cas d'allergie alimentaire au lin sont diagnostiqués : un cas avec prick test positif et prouvé par DBPCFC positif à 265 mg, un cas présentant des réactions anaphylactiques récidivantes aux pains spéciaux avec graines de lin (prick test 10,5 mm et RAST 11,5 kU/L).

Sur 44 enfants sensibilisés, 39 ont une allergie alimentaire, et 31 une sensibilisation associée à des aéroallergènes dont 30 aux pollens.

Sur 33 adultes sensibilisés, 10 ont une allergie alimentaire, 21 ont une allergie respiratoire ou une dermatite atopique et une sensibilisation aux aéroallergènes (dont des pollens).

Au total, 63% des patients sensibilisés au lin ont une allergie alimentaire quelconque, 67% sont sensibilisés aux pollens et 0,15% ont une allergie alimentaire au lin.

Réactions croisées

L'étude des sensibilisations associées, chez les enfants et adultes atopiques sensibilisés aux protéines de lin, montre dans presque tous les cas, des polysensibilisations étendues tant aux Pneumallergènes qu'aux allergènes alimentaires. Les Pneumallergènes les plus courants prédominent : pollens de Graminées, bouleau, frêne, plantain, armoise, épithelia de chat et chien.

Les IgE spécifiques au lin ont été déterminées dans 26 cas de sensibilisation détectée par PIP, avec présence dans 16 cas. Parmi ceux-ci, 14 sérums avec IgE spécifiques au lin compris entre 1 et 11 kU/L ont été analysés par inhibition de RAST par les extraits de graines de soja, arachide, lupin, blé, colza : L'inhibition atteint des taux significatifs jusqu'à 78%, homogènes pour les cinq graines testées et pour le pollen de colza. Sur ces 14 sérums, 10 ont des IgE spécifiques à la broméline. L'inhibition du RAST lin par la broméline est constante.

Prick tests avec le lin maturé et le lin extrudé

Chez six sujets des prick-tests ont été pratiqués avec les graines de lin naturel et les produits Valorex, lin maturé et lin extrudé. Le sujet allergique au lin conserve une positivité aux lins

maturé et extrudé, alors que les sujets sensibilisés sont négatifs à ces produits. Les RAST inhibition aux trois types de lins montrent une inhibition significative avec 12/14 sérums.

Electrophorèse

Les profils électrophorétiques mettent en évidence trois bandes de poids moléculaire 10,25 et 30 kDa, similaires dans les trois produits testés. (cf. précedemment).(figure 16).

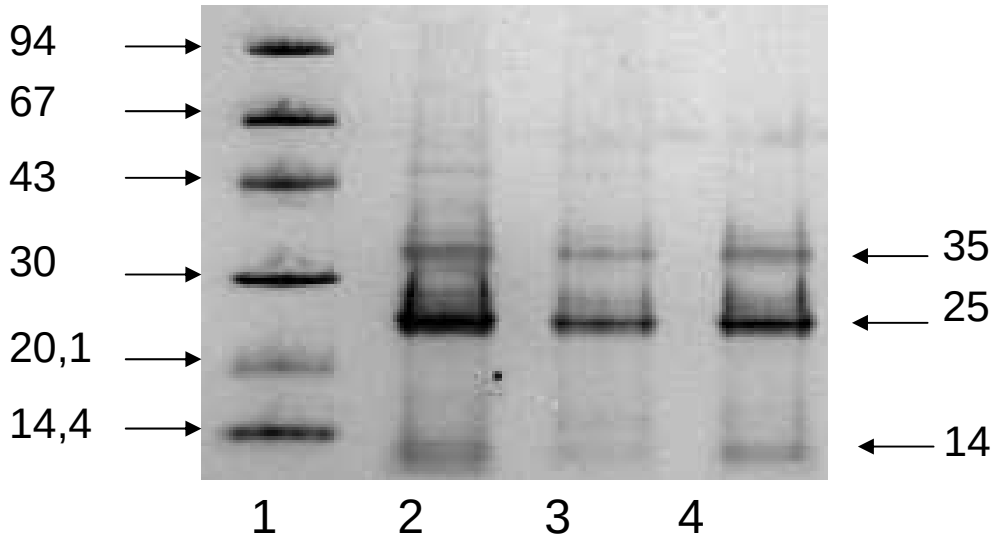


Figure 16: SDS-PAGE (8-25%) of different protein extracts stained with Coomassie brillant blue
Lane 1: standard MWs
Lane 2: natural flaxseed
Lane 3: heated flaxseed
Lane 4: extruded flaxseed

IRTF

L'analyse par spectométie infrarouge à transformée de Fourier montre des modifications du spectre dans la zone 1200 à 1700cm-1.(figure 17)

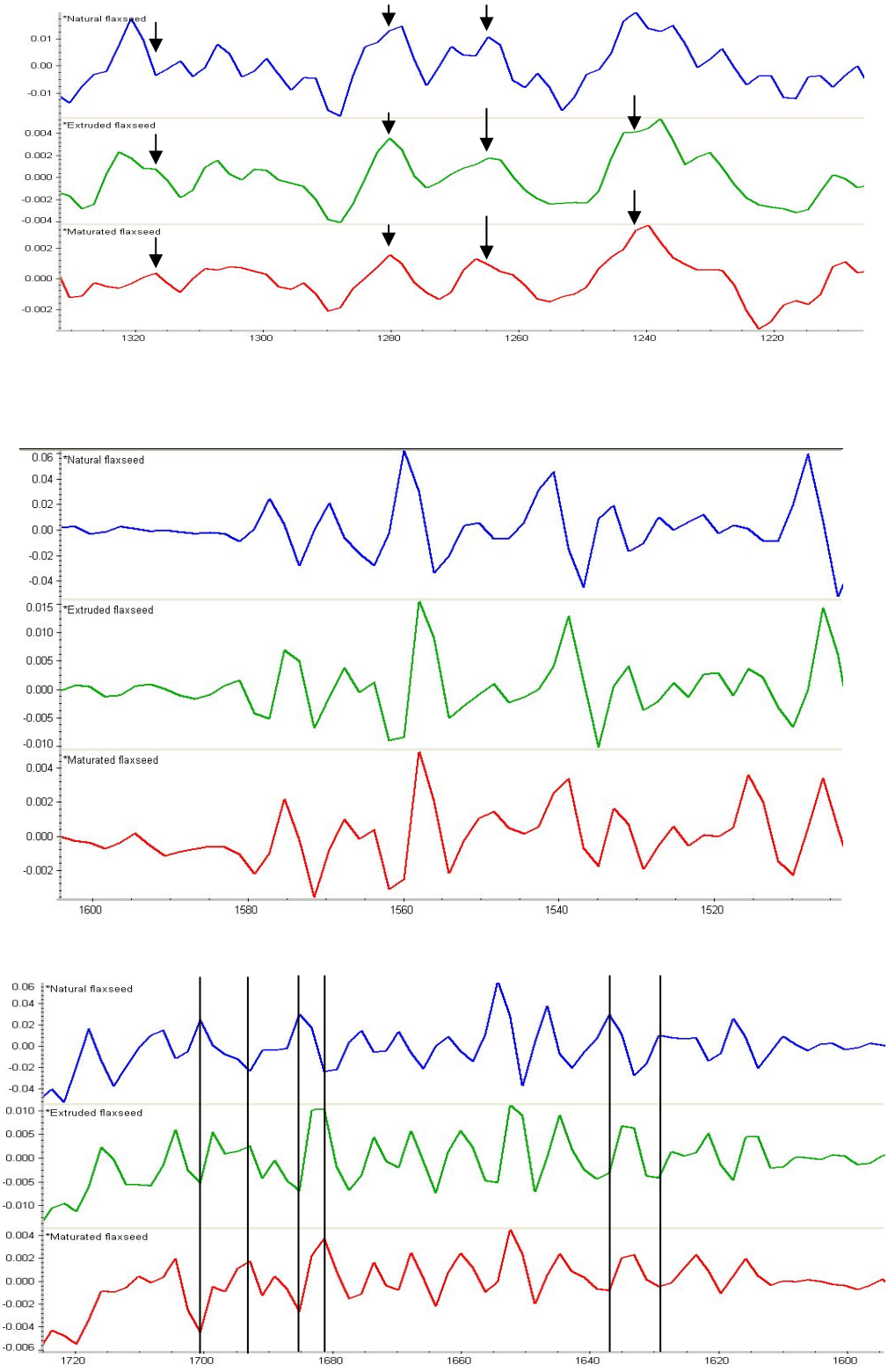


Figure 17: Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectroscopy
Comparison of transmittance second-derivative spectra in the amide I (1720-1600 cm^{-1}), amide II (1600-1500 cm^{-1}), and amide III (1350-1200 cm^{-1}) regions of natural, heated and extruded flaxseed.

Immunoblot et inhibition d'immunoblot

Deux immunoblots ont été réalisés avec deux sérums de patient. Un immunoblot montre plusieurs bandes de 15 à 29 kDa présentes dans le lin nanturel et le lin traité et deux bandes supplémentaires de 42 et 77 kDa présentes uniquement dans le lin naturel.

Le second immunoblot révèle deux bandes de 34 et 45 kDa dans le lin naturel et une seule bande de 45 kDa dans le lin traité.

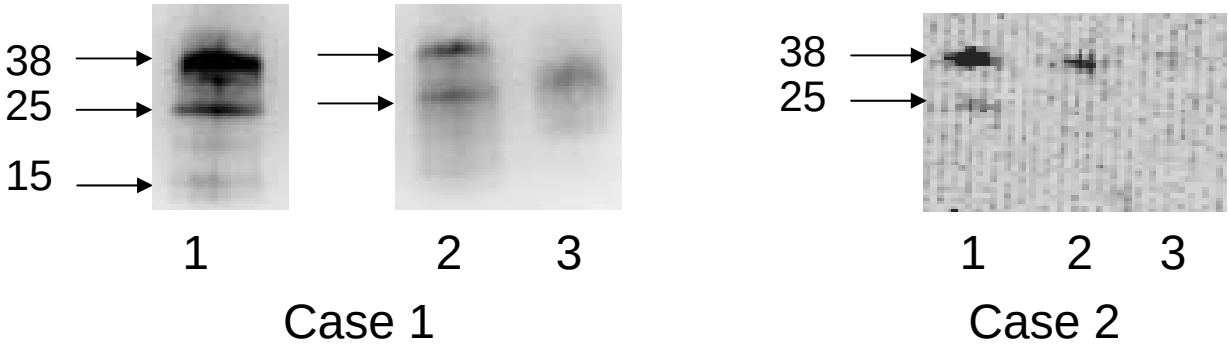


Figure 18: Immunoblot carried out with the serum of a sensitized patient
Lane 1: natural flaxseed
Lane 2: heated flaxseed
Lane 3: extruded flaxseed

Case 1: patient 6, sensitized to flaxseed (RAST 8.5 kU/L)
Case 2: patient with food anaphylactic reaction to bread containing flaxseed (RAST 10 kU/L)

DISCUSSION

Prévalence

L'étude de Frémont et al (2008) met en évidence une prévalence de la sensibilisation au lin de 5% environ mais 50% des patients étudiés sont atopiques. En fait, dans l'étude l'allergie est rare puisque seulement deux patients présentent une allergie au lin.

Modification de l'allergénicité

Structure :

L'étude des protéines par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier met en évidence une modification des structures secondaires, alpha et béta des protéines après maturation et une très nette modification des structures alpha après extrusion. L'étude des protéines par

IRTF permet d'évaluer l'impact du procédé industriel sur la protéine au-delà de sa structure primaire préservée. L'analyse en dérivée seconde sur le domaine 1200-1700 cm-1 donne des informations précises sur les fonctions amide des protéines. Les structures alpha en hélice sont observées entre 1650 et 1658 cm-1 et entre 1640 et 1620 cm-1, plusieurs bandes sont observées correspondant à des forces différentes des liaisons et à la variation des dipôles. Les bandes plus faibles à 1630 correspondent aux structures beta sheet. L'ensemble des spectres a été analysé en comparaison à des spectres de référence (ex : spectre de la beta lactoglobuline essentiellement composée de structure beta). Il est recommandé d'étendre l'analyse du spectre aux zones amide secondaire et tertiaire afin de mieux visualiser les changements (Van de Weert, 2001). Seabourn (2008) a étudié la modification du spectre dans la zone de la fonction amide tertiaire (1200-1350 cm-1) des protéines de gluten au cours du mélange d'une pâte réalisée à partir de la farine. Il met en évidence une augmentation des structures hélices alpha, feuillets beta laissant suggérer que le traitement des protéines entraine une conformation plus ordonnée.

Les profils électrophorétiques ne mettent pas en évidence de modifications de poids moléculaires des protéines présentes dans les différents produits testés.

Allergénicité

La fréquence des prick-tests positifs à de multiples allergènes aériens ou/et à des allergènes alimentaires fait suspecter des réactions croisées qui expliqueraient cette discordance entre la fréquence de la sensibilisation, et la rareté d'allergie au lin. La positivité des inhibitions de Rast à différentes graines pourrait indiquer qu'une partie des réactions croisées est tributaire de protéines de stockage qui représentent une part importante des protéines totales des graines. Cependant, la fréquence des polysensibilisations polliniques, la constance de l'inhibition du Rast au lin par la broméline, ainsi que l'inhibition de l'immunoblot lin par un extrait d'arachide, font emettre l'hypothèse d'un rôle des CCD dans ces réactions croisées, expliquant la fréquente positivité des PIP au lin chez nos patients. Les anticorps anti-CCD sont relativement fréquents, en particulier chez les sujets polysensibilisés polliniques et les sujets allergiques ou aux venins d'hyménoptères (Mari 2002, Malandain 2005, Jappe 2006) … La relevance clinique des IgE anti-CCD est très discutée (Fötisch 1999, Vieths, 2002). En général ces anticorps ne paraissent pas impliqués dans les allergies alimentaires (van der Veen , 1997).

Chez les sujets sensibilisés, la négativation des PIP par les produits maturés et extrudés, fait postuler une dénaturation conformationnelle de protéines glycosylées.

L’étude des immunoblots semble mettre en évidence la fixation des IgEs de patients allergiques à une protéine de 45 kDa , thermostable qui est retrouvée dans le lin maturé. Elle ne correspond pas à l’allergène retrouvé dans notre travail précédent, ni à celui décrit par Leon et Lezaun.

Cette étude met en exergue une problématique constante dans le diagnostic de l’allergie tant au niveau des prick tests qu’au niveau des tests in vitro qui est celle de la nature de l’allergène testé : ici on observe que le lin naturel, présentant des protéines glycosylées va générer un nombre important de réactions croisées, non relevantes cliniquement mais pertubant considérablement l’interprétation du bilan.

Les chiffres avancés par cette étude correspondent à une consommation encore minimale des protéines de lin. Etant donné leurs avantages nutritionnels, elles pourraient se répandre dans l’alimentation.

III. ALLERGENICITE ET BIOTECHNOLOGIES : LES PROTEINES RECOMBINANTES

III.2. LES ALLERGENES RECOMBINANTS : OUTILS DIAGNOSTIQUES

Présentation des travaux : *P. Franck, F. Codreanu, C. Astier, S. Jaquenet, O. Roitel, B. Thouvenot, B. Proust, DA. Moneret-Vautrin, JL. Olivier, B. Bihain, G.Kanny*. **IN VITRO ANALYSIS OF PEANUT ALLERGY BY USE OF RECOMBINANT ALLERGENS IN THE BASOPHIL ACTIVATION TEST.**

Soumis à Clin Exp Immunol

CONTEXTE DE L'ETUDE :

La production d'allergènes recombinants ou d'épitopes d'un certain nombre d'allergènes alimentaires permet d'envisager un diagnostic moléculaire de l'allergie alimentaire basé sur un profil de sensibilisaltion protéique spécifique et propre à chaque patient. En outre une corrélation entre profil de sensibilisation et la sévérité de l'allergie alimentaire peut être déterminée (Morisset 2008, Astier 2006).

Différents allergènes recombinants alimentaires ont été produits, utilisés et évalués dans différents tests diagnostiques *in vitro*.

Des tests de détection des IgEs sont commercialisés pour les allergènes suivants : r Tri a 19 (oméga 5 gliadine), r Ber e 1 (Noix du Brésil), r Gly m 4, PR-10, Bet v 1, Ara h 1,2,3, Ara h 8, r Pru p 1,3,4….. ;

En outre d'autres allergènes recombinants ont été testés : Les allergènes de la carotte (r Dau c 1.0104, r Dau c 1.0201, r Dau c 4) ont été testés par une méthode ELISA (Ballmer-Weber 2005) ; Reuter et al (2006) obtiennent une sensibilité de 95% pour un test de détection des IgEs avec les allergènes recombinants de cerise r Pru av 1,3 et 4 contre une sensibilité d e65% avec un extrait commercial.

Les tests diagnostiques in vivo utilisant des allergènes recombinants alimentaires sont actuellement moins évalués. Astier et al (2006) montrent que l'utilisation des allergènes recombinants d'arachide r Ara h 1, r Ara h 2, r Ara h 3 pour la réalisation de prick tests est un outil diagnostique efficace. Aucune corrélation n'est mise en évidence entre le diamètre du prick test, ni le taux des IgEs avec la sévérité de la maladie. En revanche l'étude met en évidence une corrélation entre le profil de sensibilisation et la sévérité de la maladie : une

monosensibilisation à Ara h 2 correspond à une sévérité clinique moindre qu'une polysensibilisation Ara h 2/ ara h 1 ou Ara h 2/Ara h 3.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Cette étude complète l'étude de Astier et al (2006) qui a évalué les allergènes recombinants d'arachide dans les méthodes diagnostiques prick tests et détection d'IgEs (ELISA). Le travail présenté évalue l'activité biologique des allergènes recombinants par le test d'activation des basophiles.

NB : Le travail est ici présenté sous la forme du manuscrit soumis. Les références bibliographiques citées dans le texte sont celles incluses en fin de manuscrit.

INTRODUCTION

The diagnosis of IgE-mediated food allergy is mainly based upon an evocative clinical history. The "gold standards" for this diagnosis remains the double-blind. placebo controlled food challenge or positive skin tests. Nevertheless. there are practical and ethical limitations that hamper the use of these tests in daily clinical practice. The detection of specific IgE. if available. is used to complete the diagnosis.

A functional *in vitro* test, the basophil activation test (BAT) has been proposed as a useful tool of allergy diagnosis. The general concept of these tests is to mimic *in vitro* the contact between allergens and the cells responsible for the clinical symptoms [1]. There is considerable recent evidence that basophils are clinically relevant. Indeed. they are now considered as equivalent to tissue mast cells, since they themselves play a pivotal role in the immediate allergic reaction. To date, however, only two studies have validated the CD63-based BAT in patients with food allergy [2,3] using native proteins extract.

The diagnostic value of skin prick tests, as well as measurement of specific IgE and basophil activation tests are highly dependent on the food extracts used, which differ in their content depending on the origin of raw material and extraction, purification and storage procedure [4,5]. The food extracts may therefore be heterogeneous with regards to the presence of stimulant and/or inhibitory components such as preservatives, endotoxins and lectins [6].

Production of recombinant allergens could lead to standardized reagents for diagnosis of food allergies. In several component-resolved diagnostic studies in food allergy, purified recombinant proteins were used to achieve the molecular characterization of a protein and analysis of its allergenic activity [7}, to improve the diagnostic tests such as fluoroimmunoenzymatic assay for specific IgE detection of birch pollen allergens [8] or

ELISA assays for specific IgE detection of peanut allergens [5], carrot allergens [9], peach allergens [10], or immunoblotting of birch pollen allergens and apple proteins [11] or microarray immunoassay for peanut allergy [12], or different food allergens [4].

We know of only one study [13] that validated the CD63-based BAT in patients with pollen-associated food allergy using purified recombinant allergen.

The aims of this study were i) to evaluate the diagnostic value of the BAT in peanut allergy for which the majors allergens are well-known and the diagnosis tests (SPT) for specific IgE are well-established ii) to compare the results of BAT to native protein extract (CPE) with BAT to three recombinant allergens rAra h1. rAra h2 and rAra 3.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Thirty patients (age range: 3-20 years old) allergic to peanuts (FA). 15 non atopic subjects (controls) and 15 patients allergic to birch pollen without food allergy (PA) were included in this study (Table1). The study was reviewed and approved by the local ethical committee, and all signed informed consent forms of the patients or their parents are on file.

Food allergy to peanuts was assessed by clinical history, positive SPT, and/or sIgE levels (CAP-system FEIA) greater than 15kU/L or a positive double bind placebo controlled food challenge (DBPCFC).

The clinical severity of the allergy reaction was evaluated on a scale between 0 and 5 [5]. This grading system is the following : 0, no symptoms; 1, abdominal pain that disappeared without requiring medical treatment, rhinoconjunctvitis, urticaria fewer than 10 paulas, rash (eczema onset); 2, one organ involved, abdominal pain requiring treatment, generalized urticaria, nonlaryngeal angioedema, mild asthma (cough or fall of peak expiratory flow< 20%); 3, two organs involved; 4, three organs involved or asthma requiring treatment or laryngeal oedema or hypotension; 5, cardiac and respiratory symptoms requiring hospitalization in intensive care.

The clinical features occurring after accidental ingestion were scored for three patients at grade 1, six others at grade 2, three at grade 3 and seven at grade 4. The DBPCFC included symptoms of grade 1 in six patients, grade 2 in three, grade 3 in five, and grade 4 in three [5].

Table 1. Clinical data for patients with peanut allergy

					Clinical history of peanut allergy		DBPCFC to peanut			
Patient no.	**Age (y)**	**Sex**	**Atopy clinical manifestations**	**Foods sensitization***	**Symptoms**	**Clinical score**	**CD (mg)**	**Symptoms**	**Clinical score**	**PsIgE (kU/L)**
1	20	F	AD, RC, A	n, l	U, LAO	4	965	U, OAS, G, A	-	67.8
2	3	M	AD	n	U	1	500		-	5.87
3	10	F	AD, RC	n		-	965	P, G, AST	1	1.83
4	15	F	AD	l	U	2	7000	U, G	3	91.9
5	7	M	AD		U	2	44.4		-	1.82
6	4	M	AD	n		-	44.4	A	2	15.3
7	15	F	AD	n	U, RC, G, A	4	3500	U, G, RC	4	45.6
8	7	M	AD	n		-	7000	G	2	2.18
9	5	M	AD	n	U	1	44.4		-	2.69
10	7	M	AD, RC, A	n		-	500	G, RC	-	14.3
11	14	F	AD, RC, G	n, l	U, G, LAO	3	500	G, OAS	1	100
12	4	M	AD			2	500	P, G, RC	4	3.87
13	9	F	AD, G, A	n	U, A	2	965	U, OAS	1	9
14	6	M	AD	n	U, RC	3	44.4		-	2
15	19	F	AD, RC, A			-	500	G, A	3	42.3
16	6	M	AD, RC	n, e	U	2	215	A	1	39.90
17	5	F		e, m, mu		-			-	100
18	6	M	AD	n, e, l		-	500	PL, G, RC, AST	4	100
19	6	M	AD, RC	n, l	A	3	1500	G, AST	3	100
20	11	M	AD, RC	e, f	G, AS	4	265	PL, OAS	2	42.3
21	3	F	AD, A	e, m		-	500	U, G, AST	1	95
22	13	F	AD, A	n, l	U	2	44.4		-	10.4
23	8	M	AD, RC, A	n, e, m, w		-	15	RC	-	28
24	10	M	A	l	A	4	44.4		-	66.3
25	8	F	AD, RC, A	n, l	A	4	215	G	-	13
26	10	M	AD, A	n		-	500	U, PL	3	4.80
27	10	M	AD, RC	n, f, l	U	4	265	U	-	7.62
28	9	F	AD	n, l	U	1	500		-	1.31
29	11	M	AD, RC		U, RC, A	4	215	U, RC	3	14.5
30	14	M	AD	n, ef, f, s		-	65	G	1	25.5

Symptoms: AD, atopic dermatitis; RC, rhinoconjunctivitis, A, asthma; G, gastrointestinal symptoms; U, urticaria; LAO, laryngeal angioeodema; AS, anaphylactic shock; OAS, oral allergy syndrome; AST, asthenia; P, prurit; PL, laryngeal prurit. Food allergy: e, egg; f, fish; l, legumes; m, milk; n, nuts; s, sesame; w, wheat; * determined using SPT. Clinical scores were defined as described in methods. CD: cumulative dose; PsIgE (peanut-specific IgE) determined using the Cap RAST system (Pharmacia)

Recombinant peanut allergens rAra h 1, rAra h 2, rAra h 3

Recombinant Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 were produced according to the recommendations of good manufacturing practice for recombinant allergens [5]. The recombinant proteins were preserved in a 50% glycerol solution and stored at –20°C. Two concentrations were tested for each allergen in all patients. These proteins were tested at the final concentrations of: 5µg/ml (rAra h1) or 8 µg/ml (rAra h 2, rAra h 3).

Skin prick test (SPT) and direct ELISA for determination of allergen-specific IgE

The methods of the skin prick test and ELISA specific IgE were performed as described previously [5].

Basophil activation tests

Samples :

BAT was performed using the chemotactic peptide N-Formyl Met-Leu6Phe (fMLP) as a positive control, and washing solution or glycerol 50% solution as negative background controls.

The recombinant proteins were tested at final concentrations of 5µg/ml (rAra h1) or 8 µg/ml (rAra h 2, rAra h 3).

A commercial protein extract of roasted peanut (CPE) (Allerbio, Varennes en Argonne, France) was tested at a final concentration of 8.5 µg/ml diluted in Phosphate buffer saline (CPE-PBS) or in glycerol 50% solution (CPE-Gly).

Test for cellular activation:

The BAT (Orpegen, Beckton Dickinson, France) was performed according the manufacturer recommendations.

Heparinized whole blood (10µl) was incubated with allergens at final various concentrations for 20 minutes at 37°C. The cells are then labelled with the two- colour antibody reagent consisting of two different murine monoclonal antibodies: 1) the monoclonal antibody anti IgE-PE that reacts with human IgE and detects basophilic granulocytes, and 2) the monoclonal antibody anti CD63-FITC that recognizes a glycoprotein expressed on activated basophils.

Flow cytometric analysis:

Cells were analyzed by flow cytometry using an EPICS XL (Coulter Beckmann, France) equipped with a 488 nm laser.

Cells were analyzed by gating on basophilic granulocytes expressing high amounts of IgE (1000 cells). The results were expressed by the percentage of activated basophilic granulocytes CD63+ (figure 1).

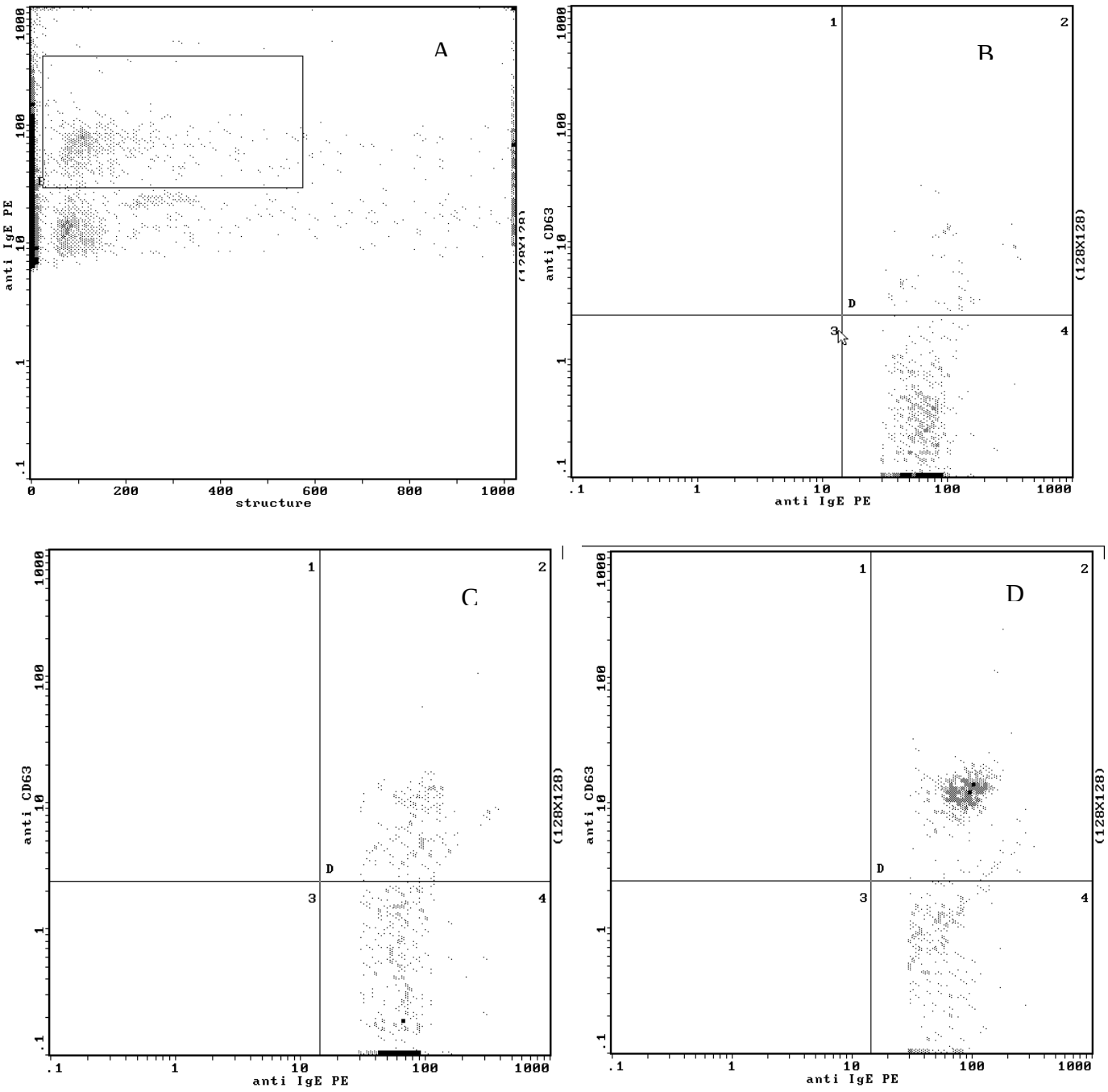


Figure 1: Flow cytometric analysis: A) The basophil population was gated by the expression of PE antiIgE. The expression of CD63 was analysed on this gated cell population: B) negative control without stimulation, C) positive control with fLMP activation, D) after incubating with allergens.

According to the manufacturer recommendations, more than 15% of activated basophils were considered as a positive test for the native protein.
Considering the high level of response in negative control in glycerol (mean: 9.3%. SD: 5.3), we set the positivity threshold (cutoff) for a positive BAT at 20% CD63+ basophils (cutoff> mean + 2 SD) for the recombinant allergens.

Sample having more than 15% activated basophils in the negative control were discarded because of a high basal activation.

Statistics

Data are expressed as means ± SDs. Statistical analyses were performed by using the Student t for comparison between two groups. A p-value< 0.05 was considered statistically significant.
In order to calculate sensitivity and specificity, clinical history was considered the "goldstandard". A true positive result (TP) was defined as a positive BAT in a patient allergic to peanut; a false positive result (FP) was defined as a positive BAT in a non allergic patient; a true negative result (TN) was defined as a negative BAT in a non allergic patient and a false negative result (FN) was defined as a negative BAT in an allergic patient.

RESULTS

Basophil activation test

The patients having a basal mean percentage of CD63+ basophils higher than 15% (negative control higher than 15%) were excluded from the study and included two food allergic patients, four control patients, and one pollen allergic patient respectively.
The mean percentage of CD63+ basophils after incubating the basophils with wash buffer (negative control) was 6.6% (SD 2.9%) in the FA patients (n=28), 6.1% (SD 2.5%) in the controls (n=11) and 5.5% (SD 1.6%) in the PA patients (n=14).
The mean percentage of CD63+ basophils after incubating the basophils with 50% glycerol solution (negative control) was 9.3% (SD 5.3%) in the FA patients, 13.1% in the controls (SD 5.3%) and 8.8% in the PA patients (SD 5.5%). We set the positive test threshold (cutoff) at a positive BAT of 20% CD63+ basophils (cutoff > mean basal activation + 2SD).
Incubation of the basophils with fMLP (positive control) resulted in a mean basophil activation of 40.1% (SD: 14.9%) in the FA patients, 36.3% (SD : 16.35%) in the controls and 31.23 % (SD : 13.8%) in PA patients.

Results of negative and positive controls in the groups of allergy patients did not significantly differ from the outcome in the nonallergy patients.

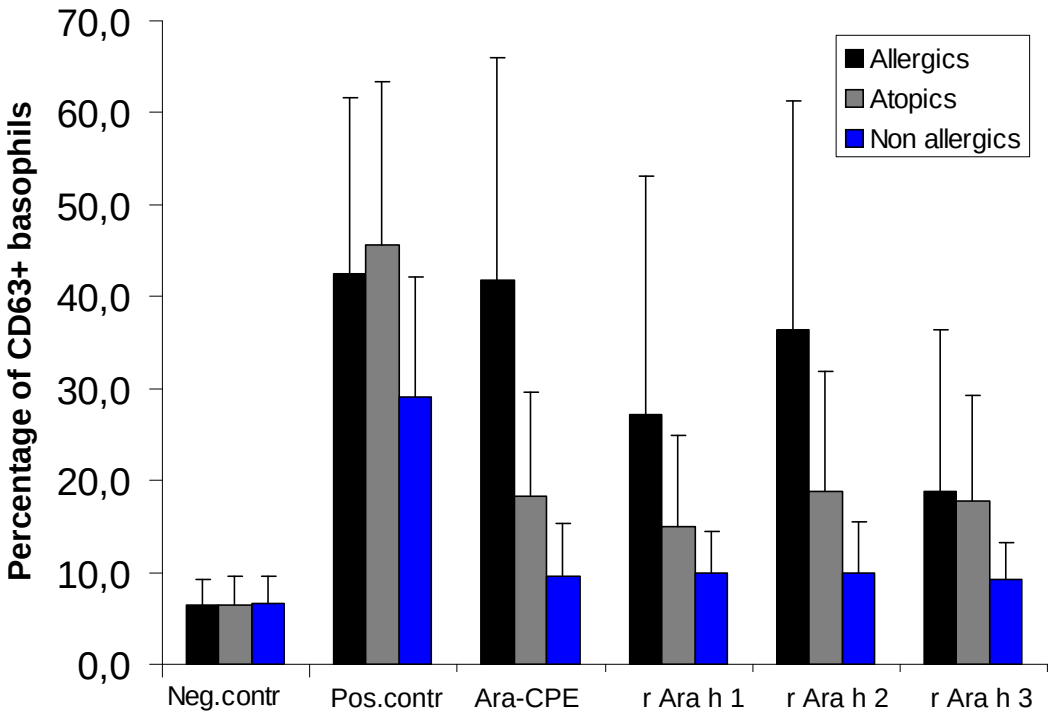
Results after incubating the basophils with different allergens are shown in Table 2.

Table 2. BAT results: Mean percentage of CD63+ basophils (SDs) after incubation with different allergens. * p<0.001; ** p< 0.05.

Allergens	**Peanut allergy (n=28)**	**Controls (n=11)**	**Pollen allergy (n = 14)**
Negative control in wash solution	6.6 (2.9)	6.1 (2.5)	5.5 (1.6)
Negative control in 50% glycerol solution	9.3(5.3)	13.1 (5.3)	8.8 (5.5)
Positive control	40 (14.9)	36.3 (16.3)	31.2 (13.8)
Native peanut in PBS	41.8 (24.3)*	9.7 (5.3)	7.3 (5.3)
Native peanut in glycerol solution	39.7(21.3)*	15.8 (10.3)	9.3 (5.9)
r Ara h 1	27.7 (25.5)**	10.6 (3.8)	9.2 (4.4)
r Ara h 2	31.9 (22.5)**	13.5 (8.4)	8.9 (4.5)
r Ara h 3	16.6 (13)	13.3 (6.5)	8.1 (3.4)

Comparison of the mean percentage of CD63+ basophils showed significant differences between FA patients and controls with native protein and with recombinant allergens r Arah 1 (p = 0.03) and r Ara h 2 (p< 0.003). In the group of food allergy patients, BAT with native protein (CPE –gly) and r Ara h2 were not significantly different. BAT with native protein (CPE –gly) was significantly higher than BAT with r Ara h1, (Figure 2). The mean percentage of CD63+ basophils with r Ara h3 did not show significant differences between the three patient groups.

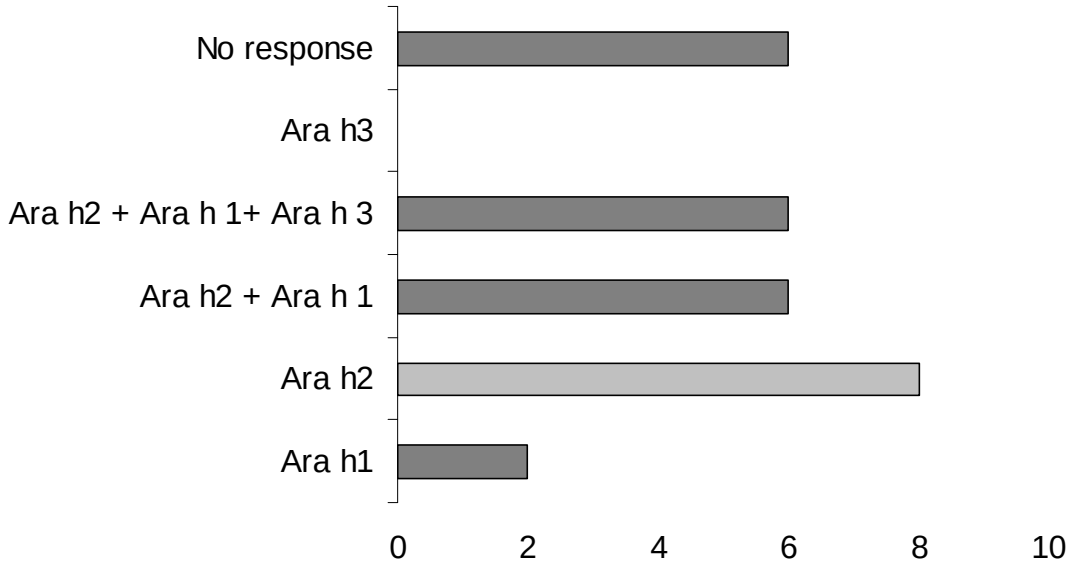
Figure 2: Mean basophil activation in the BAT in peanut allergy patients (n=28), in pollen allergy patients (n=15) and in control subjects (n=15) after incubating with CPE in glycerol, rAra h1, rAra h2, rAra h3 and a negative and positive control (fMLP).



One control patient showed a BAT higher than 20% after incubating the basophils with CPE-gly. The BAT with three recombinant allergens remained negative.
One atopic patient showed a BAT higher than 20% after incubating the basophils with CPE-gly and CPE-PBS. The BAT with three recombinant allergens remained negative.

In the peanut allergy group (n=28), six patients showed a BAT lower than 20% after incubating basophils with CPE-gly (with a positive test higher than 15%). The BAT with three recombinant allergens were negative.
All 22 allergy patients with a positive BAT with CPE-gly showed a positive BAT with at least one recombinant allergen: 14 with r Ara h1, 20 with r Ara h2 and 6 with r Ara h 3.
Eight patients reacted only to rAra h 2, two patients reacted only to rAra h 1.Twelve patients reacted to 2 or 3 recombinant allergens (Figure 3). A total of 71% of peanut allergy patients reacted in the BAT to rAra h 2 and 50% patients to r Ara h1.

Figure 3: Positive BAT with recombinant peanut allergens in allergic patients.



Concordance BAT – SPT (Table 3):

Comparing the rate of concordance between BAT and SPT (and including both negative or positive tests) yielded the following results: with r Ara h1 both tests gave the same test result in 22/28 (78%) subjects; with r Ara h2 in 20/28 (71%) subjects, and with rAra h 3 in 22/28 (78%) subjects.

In 15/28 (53%) subjects, the results were similar for all three allergens in both tests (BAT and SPT).

Concordance BAT – sIgE (Table 3)

Comparing the rate of concordance between BAT and specific IgE including both tests negative or positive led to the following results: with r Ara h1 both tests gave the same test result in 24/28 (85%) subjects; with r Ara h2 in 20/28 (71%) subjects, and with rAra h 3 in 22/28 (78%) subjects.

In 14/28 (50%) subjects, the results were similar for all three allergens in both tests (BAT and sIgE).

Table 3: Rate of concordance between the BAT and SPT or IgEs.

r Ara h1	BAT+	BAT -	
SPT +	10	2	12
SPT -	4	12	16
	14	14	28

r Ara h1	BAT+	BAT -	
IgEs +	12	2	14
IgEs -	2	12	14
	14	14	28

r Ara h2	BAT+	BAT -	
SPT +	20	8	28
SPT -	0	0	0
	20	8	28

r Ara h2	BAT+	BAT -	
IgEs+	20	8	28
IgEs -	0	0	0
	20	8	28

r Ara h3	BAT+	BAT -	
SPT +	4	4	8
SPT -	2	18	20
	6	22	28

r Ara h3	BAT+	BAT -	
IgEs+	3	3	6
IgEs -	3	19	22
	6	22	28

Sensitivity and specificity

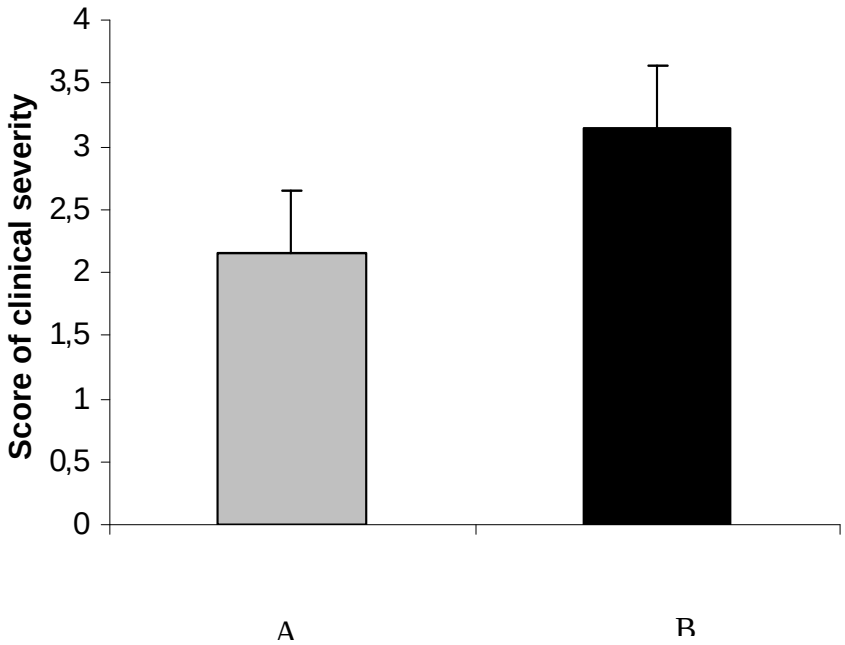
Specificity was calculated based not only on the 11 non atopic controls, but also on the 14 pollen allergic patient subjects.

On the basis of the 20% cutoff, sensitivity and specificity of CPE-gly were 78% and 92%. Sensitivity and specificity of the three recombinant allergens (positive BAT with at least one allergen) were 78% and 100% respectively.

Clinical severity

Patients who were monosensititized to Ara h 2 had a significantly lower severity than polysensitized patients ($p < 0.05$) (Figure 4). There was no correlation between the mean percentage of activated basophils and the clinical score of severity (data not shown).

Figure 4: Peanut allergy severity in r Ara h2 monosensitized (A) and polysentitized patients (B) as defined by BAT.



DISCUSSION:

Functional *in vitro* tests have generally focused on basophil mediator release assays such as histamine and leukotriene release tests. Different practical and technical shortcomings have restricted their clinical applications [6]. The opportunity to use a functional basophil-based assay, being superior in terms of standardization and quantification compared with functional *in vivo* tests has raised particular interest in its diagnostic potentials [14]. It has now been shown in several studies that the BAT proves to be a reliable tool for the diagnosis of different IgE-mediated allergies including natural rubber latex allergy [15], hymenoptera venom allergy [3] and drug allergies (1,23). The technique has also been assessed in food allergies that result from cross reactivity to pollens allergens [16,17].

However, despite the type of diagnostic method used (SPT, IgEs, BAT), there is a great deal of variability and difficulty of standardization because of the heterogeneity of the extract composition. The diagnostic sensitivity and specificity varies between different foods and

different studies. So far, no *in vitro* test reliably predicts clinical food allergy [18]. Recombinant allergens from several foods such as hazelnut, celery, apple, carrot, cherry and peanut are now available. Several studies evaluated the diagnostic value of these allergens and showed an improved sensitivity of the diagnostic tools.

The aims of our study were to extend the validation of the BAT in food allergy by investigating samples from a clinically well-defined panel of peanut allergy patients and to evaluate the diagnostic performance of the BAT using recombinant peanut allergens (rAra h1, rAra h2, rAra h3).

The general rationale for introducing cellular tests has been that BAT closely resembles the *in vivo* pathway. The advantage of using sensitized basophils is that a wide range of foodstuffs can be used, including raw material or recombinant allergens.

These undeniable advantages of an easily realizable functional test are however limited by technical shortcomings related to the fact that one works with living cells, which makes standardization of the test difficult.

Some variables determine the test outcome and performance of the BAT. Ebo and al [6] identified the conditions that could affect the outcome of the test. The type of reagents used can be a first source of variability. The marking of activated basophils can currently be done by two different markers: CD63 or CD 203. The studies do not make it possible to clearly highlight a superiority of a marker in particular in the food allergy . We used CD63, whose expression is associated with degranulating basophils [14] and used a labelling protocol in whole blood that did not require preliminary leucocytes separation. Even if it interferences with serum components can exist [6], it remains preferable to leave the cells in their medium of origin (blood) to limit non specific activations related to various handling procedures necessary for cell separation which could lead to platelet adhesion to basophils [14], and to preserve the viability of the cells. The medium of the stimulating allergen used can itself cause instability of the cell, since the basophils have a membrane sensitive to nonspecific stimulations. In our study, the use of glycerol solutions for the allergens required a re-evaluation of the cut off level of BAT. The glycerol destabilized the cell membrane by increasing its fluidity and induced a higher rate of basal activation of basophils. We established a positive threshold level of more than 20% activated basophils as the optimal cutoff, rather than the the usual cutoff of 15% [19].

A broad variability in basophils exists between different basophil donors. Some patients, although allergic, failed to upregulate CD63 with regard to IgE mediated basophilic activation [6]. In the normal population, about 10-20% of donors possess basophils that have no

response to crosslinking of the IgE receptor [13, 6, 20, 19, 14]. The mechanism has been recently identified as a selective decrease in Syk expression in the non-releasing basophils [21]. These non-responders represent 21% (6/28) of the allergy patients in our study. They are registered by (i) a positive control using fMLP higher than 15%, and (ii) a non-response with CPE and recombinant allergens. The allergy patients were well-defined in our study and so we can easily identify the non responders. However, a positive control with a polyclonal anti-IgE antibody which mimics an IgE –mediated activation could be important for the confirmation of the absence of basophils activation [1]. In non-responders, BAT cannot be used as a diagnostic tool. Moreover, these patients are capable of influencing sensitivity and specificity of the BAT. In our study the sensitivity was improved and increased up to 100% if the non responders were excluded from our data.

Another origin of variability for BAT is due to the nature of allergens and the tested concentrations. The allergens variability is great and depends on the origin of raw material, on the storage procedures, and on the allergen forms (crude peanut, roasted peanut, lyophilized peanut or commercial protein extract) and on the presence of non-specific stimulants or inhibitory components such as preservatives, endotoxins and lectins. Two types of allergens were used in the study: commercial protein extract of roasted peanut in glycerol solution and three peanut recombinant allergens (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3) in glycerol solution. Two different concentrations of allergens were tested for each allergen and each patient. A dose-dependency was observed (data not shown), showing a specific activation [19].

Using recombinant allergens in BAT allowed the evaluation of IgE dependent response with standardized assays. Initially, the recombinant technology has advanced the structural analysis of allergens, the characterization of IgE epitopes and the effector cell activation [21]. In several component-resolved diagnostic studies in food allergy, the use of recombinant allergens has clearly led to a higher sensitivity of the IgE immunoassay compared with the conventional allergen extracts [9,22,23]. Erdman et al [13] applied the recombinant allergens for the first time in the BAT to study pollen-associated food hypersensitivity to apple, carrot and celery. The sensitivity of the BAT for Mal d , Dau c 1 and Api g 1 was 75. 65 and 75%. In our study, BAT with recombinant allergens rAra h1, rAra h2 and rAra 3 showed a sensitivity of 78%.

The sensitivity and the specificity were comparable with recombinant allergens (at least one positive BAT with one recombinant allergen) and native foods. Clearly, all patients having a positive BAT with CPE had a positive BAT with at least one recombinant allergen. Ara h 2 induced a positive BAT for 91% of these patients. Our results are in agreement with previous studies that reported the higher prevalence of IgE binding [12,24] to Ara h 1 and Ara h 2.

Moreover, basophil activation induced by r Ara h 2was similar to that induced by native allergen. The study by Palmer [20] using a functional assay with RBL SX-38 reported that that Ara h 2 is functionally more potent than Ara h 1, supporting our observations. Patients who were monosensititized to Ara h 2 had a significantly lower severity than polysensitized patients, as shown for SPT and IgE assay [5]. In pollen-associated food allergy, the IgE cross-reactivity could be due to the presence of profilins [25], to the presence of cross-reactive carbohydrate determinant (CDD) or to a structural homology [13]. Our study, using Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 showed an excellent specificity with recombinant allergens in patients allergic to birch pollen without food allergy. However one patient allergic to birch pollen showed a positive BAT to CPE and negative BAT to recombinant allergens, suggesting potential cross reactivity to CCD or profilins present in CPE and absent in recombinant allergens. Cross reactivity was shown for the peanut profilin Ara h 5 with pollen profilin Bet v 2 [24] and for Ara h 8 with Bet v 1 [26].

In conclusion, this standardized study demonstrates the higher diagnostic value of the recombinant allergens, even when nonresponders are considered. Our results suggest that the basophil activation test using recombinant allergens is an *in vitro* method feasible in the diagnosis of peanut allergy. This approach could prove to be useful when other diagnostic methods based on native allergens have demonstrated insufficient diagnostic value.

REFERENCES

1. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. Clin Mol Allergy. 2005; 30:3:9.

2. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Slodowy S, Merk HF, Sachs B. CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity. Clin Exp Allergy. 2003;33(5):607-14.

3. Ebo DG, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, Beirens LM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy. Cytometry B Clin Cytom. 2005; 28-33.

4. Bohle B, Zwolfer 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.

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.
6. Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Stevens WJ. Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. Allergy. 2006 ;61(9):1028-39.
7. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis. Treatment. and prevention of allergy. Methods. 2004;32(3):207-8.
8. Cudowska. B, Kaczmarski M. Diagnostic value of birch recombinant allergens (rBet v 1. profilin rBet v 2) in children with pollen-related food allergy. Rocz Akad Med Bialymst. 2004; 49: 111-5.
9. Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kundig T., Fotisch K, van Ree R, Vieths S. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? Clin Exp Allergy. 2005 ;35(7):970-8.
10. Diaz-Perales A, ML Sanz, et al. 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
11. Cudowska. B, Kaczmarski M, et al. Immunoblotting in the diagnosis of cross-reactivity in children allergic to birch. Rocz Akad Med Bialymst. 2005; 50: 268-73.
12. 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.
13. 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.
14. Kleine-Tebbe J, Erdmann S, et al. Diagnostic tests based on human basophils: potentials, pitfalls and perspectives. Int Arch Allergy Immunol. 2006; 141(1): 79-90.
15. Sanz ML, Garcia-Aviles MC, BATar AI, Anda M, Garcia BE, Barber D, Salcedo G, Rihs HP, Raulf-Heimsoth M. Basophil Activation Test and specific IgE measurements using a panel of recombinant natural rubber latex allergens to determine the latex allergen sensitization profile in children. Pediatr Allergy Immunol. 2006;17(2):148-56.

16. Apostolou E, Deckert K, Puy R, Sandrini A, de Leon MP, Douglass JA, Rolland JM, O'hehir RE. Anaphylaxis to Gelofusine confirmed by in vitro basophil activation test: a case series. Anaesthesia. 2006 Mar; 61(3):264-8.
17. Shields MO, Mirakhur RK, Crockard AD, Edgar JD. The use of basophil activation to diagnose allergy to Gelofusine. Anaesthesia. 2006 ;61(7):716-7; author reply 717-8.
18. Asero R, Ballmer-Weber BK, et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. Mol Nutr Food Res. 2007; 51(1): 135-47
19. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr WR, Buhring HJ, Valenta R. Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. Methods, 2004 ;32(3):265-70.
20. Palmer GW, Dibbern DA, 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
21. Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Olivier JM. Syk deficiency in noreleaser basophils. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 279-284.
21. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens molecules : tools to study effector cell activation. Imm reviews 2001, 179 : 119-127.
22. Lidholm J, Ballmer-Weber BK, et al. . Component-resolved diagnostics in food allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2006; **6**(3): 234-40.
23. Reuter A, Lidholm J, Andersson K, Ostling J, Lundberg M, 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(6):815-23.
24. Kleber-Janke T, Crameri R, et al. Patient-tailored cloning of allergens by phage display: peanut (Arachis hypogaea) profiling, a food allergen derived from a rare mRNA." J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 756(1-2): 295-305.
25. Willerroider M, Fuchs H, Ballmer-Weber BK, Focke M, Susani M, Thalhamer J, Ferreira F, Wüthrich B, Scheiner O, Breitenender H, Hoffmann- Sommergruber K. Cloning and molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Cap 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (capsicum annuum) and tomato (Lycopersicon esculentum). Int Allergy Arch 2003; 131 : 245-255.
26. 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.

10. 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.

III.1. NOUVEAUX INGREDIENTS ISSUS DES BIOTECHNOLOGIES

Présentation des travaux : *P. Franck, C. Astier,B. Thouvenot, O. Roitel, S. Jacquenet, S. L Taylor, D. Bethell, B.E Bihain, D.A Moneret-Vautrin.* **Evaluation of the risk of cross reactivity between hen's egg lysozyme and rice originated recombinant human lysozyme, by ELISA and ELISA inhibition tests and basophil activation tests**.

CONTEXTE DE L'ETUDE

Le lysozyme est une enzyme ubiquitaire impliquée dans l'immunité innée. Elle posséde la capacité de dégrader les protéoglycans de la paroi bactérienne. Le lait maternel contient une forte proportion de lysozyme et contribue à l'immunité gastrointestinale de l'enfant. L'administration de lysozyme chez les enfants montre une augmentation des immunoglobulines et des IgA secrétoires intestinales. L'intérêt thérapeutique du lysozyme a justifié sa production par les biotechnologies. Un riz transgénique produisant du lysozyme recombinant humain (rhuL) avec un fort rendement est donc attrayant, puisque le riz est aussi un aliment de l'enfant.

OBJECTIF DE L'ETUDE

Le lysozyme recombinant humain (rhuL) doit être considéré comme une protéine du soi. Cependant l'administration orale de cette protéine pourrait générer une allergie *de novo* étant donné que le rhuL posséde une homologie de séquence de près de 61% avec le lysozyme d'œuf de poule (HEL). L'objectif de l'étude a été d'évaluer les réactions croisées entre rhuL et HEL à partir de sérums et basophiles de patients allergiques à l'œuf par techniques ELISA, Inhibition d'ELISA et TAB.

MATERIELS ET METHODES

Patients

A partir de 60 sérums d'enfant allergique à l'œuf (TPO en simple aveugle au blanc d'œuf),40 sérums, positifs en IgE spécifiques (Cap system, Pharmacia) au lysozyme d'œuf de poule (HEL) ont été étudiés en ELISA, dont 30 avec et sans inhibition par rhuL.

Trente huit autres sérums d'enfant allergiques à l'œuf (TPO en simple aveugle au blanc d'œuf), positifs en IgE spécifiques au lysozymze d'œuf de poule (HEL) ont été étudiés par des tests d'activation des basophiles au rhuL, HEL, riz et lait maternel, dont 22 en ELISA avec et sans inhibition par rhuL.

TPO en simple aveugle

Le TPO a été réalisé avec du blanc d'œuf jusqu'à une dose cumulée de 965mg lors de la première progression. Si ce TPO était négatif une seconde progression était testée le lendemain jusqu'à une dose cumulée de 7110mg.

Prick-tests

Les tests cutanés ont été réalisés selon la méthode des prick-in-prick avec du blanc d'œuf cru, du lait, du poisson, du blé, du riz, du soja et de l'arachide. Un extrait commercial de lysozyme d'oeuf de poule (Allerbio) ainsi qu'une poudre de lysozyme (additif alimentaire) ont aussi été testés.

La réactivité de la peau est appréciée par un Prick test à la Codéine 9 %. Le contrôle négatif est assuré par un test au sérum salin. Un diamètre d'au moins 75% de celui obtenu avec la codéine est considéré comme positif.

Produits testés

Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule (HEL) et le lysozyme extrait du lait maternel (BML) ont été obtenus chez Sigma.

Deux lots de lysozyme recombinant (rhuL) ont été obtenus auprès de Ventria (Sacramento, USA) ayant une pureté respectivement de 85 et 95%. Un lysozyme hautement purifié (pureté à 99%) a été préparé par une chromatographie d'exclusion.

SDS PAGE

Les électrophorèses ont été réalisées en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 12% et ont été colorées au bleu de Coomasie ou à l'argent.

Immunoblot

Les immunoblots ont été réalisés en présence de sérum dilué au 1/20. Les IgEs fixées sont détectées par un anticorps anti IgE humaine conjugué à la peroxydase puis révélées par chimiluminescence.

ELISA

Des microplaques ont été coatées avec une solution en PBS de lysozyme d'oeuf de poule à 15µg/ml. Puis les plaques ont été saturées avec de la gélatine de poisson puis incubées en présence des serums de patients et des sujets contrôle. Les sérums ont été testés dilués du ½ au 1/12. Les IgEs fixées ont été détectées par un anticorps anti IgE humaines marqués à la peroxydase puis révélées par coloration à la tétraméthylbenzydine. L'absorbance à 450 nm a été lue.

Une absorbance > 0 ,10 a été déterminée comme seuil de positivité. Ce seuil a été établi à partir de la valeur moyenne obtenue avec le tampon d'incubation : 0,055±0,017 (n=34) et celle obtenue à partir de sérums de sujets non atopiques : 0,07 ± 0,006 (n=9).

Inhibition d'ELISA

Les inhibitions d'ELISA ont été réalisées en préincubant les sérums des patients avec soit du lysozyme d'œuf de poule (avec des concentrations allant de 0,1 ng/ml à 100 ng/ml) soit avec les lysozymes recombinants (avec des concentrations allant de 0,1 ng/ml à 100 000 ng/ml). Les tests ELISA ont été ensuite réalisés comme décrits précédemment.

Une diminution de 30% de fixation des IgEs a été considérée comme une inhibition significative de la fixation.

TAB

Les TAB ont été réalisés comme décrits précédemment. Le seuil de positivité a été considéré à 15%.

Les allergènes testés ont été : HEL (Sigma), BML (Sigma), rhuL 85,95 (Ventria) et 99% de pureté de protéines de riz blanc (obtenu par cuisson de 0,4g de riz blanc dans du PBS pendant 10 minutes à 100°C). Les concentrations finales testées étaient de 100 et/ou 1 µg/ml.

RESULTATS

ELISA et inhibition d'ELISA

Au total 52 ELISA et inhibition d'ELISA ont été réalisés à partir de sérums d'enfants allergiques à l'oeuf.

Dans tous les cas un résultat positif ELISA (absorbance > 0,10) a été obtenu pour les patients allergiques à l'oeuf et un résultat négatif a été obtenu pour les sujets contrôles.

L'inhibition ELISA par HEL a été obtenue pour tous les patients, inhibition allant de 32 à 93% pour les concentrations de 10 et 100 ng/ml.

Aucune inhibition ELISA par rhuL n'a été observée jusqu'à la concentration testée de 1000ng/ml. Pour sept patients, des inhibitions allant de 27 à 45% ont été observées pour des concentrations testées de10 000 à 100 000 ng/ml. (figure 19 A,B, C)

Immunoblot

L'immunoblot réalisé avec un sérum de patient allergique (IgEs anti HEL > 100 kU/L) ne montre aucune fixation d'IgE sur le rhuL 95% et BML.

BAT

Vingt-neuf BAT ont été interprétés parmi les 33 réalisés chez les enfants allergiques et 4 chez les cinq sujets contrôles. Cinq échantillons ont présenté une activation basale trop importante.

Parmi les 29 patients testés, 17/29 testés ont présenté un BAT positif à HEL et 17/23 testés au rhuL 85%. Dix neuf patients ont un TAB concordant entre HEL et rhuL 85% : 14 ont un TAB positif avec les deux produits, cinq ont un TAB négatif avec les deux produits, soit une concordance de 82%. On observe une diminution du taux de basophiles activés avec les rhuL plus purifiés. (figure 20).

Onze patients ont été testés avec rhuL 99% : 10 /11 ont des BAT concordants entre rhuL 99% et rhuL 85%.

Vingt et un BAT au riz ont été testés, 8 ont été positifs et 7/8 étaient aussi positifs au rhuL.

DISCUSSION

La prévalence de l'allergie aux protéines du blanc d'œuf dans cette étude est de 66,7% : 40/60 sérums testés pour la recherche d'IgEs ont donné un résultat positif. Cette observation conduit à penser que le lysozyme doit être considéré comme un allergène majeur. Cette prévalence élevée peut être due à la consommation accrue du HEL comme additif alimentaire (E1105). Des taux importants de lysozyme peuvent être retrouvés au niveau sanguin car la protéine résiste au chauffage, à la proétolyse enzymatique et au pH acide.

Le rhuL doit être considéré comme une protéine du soi et donc non immunogène. Cependant il existe une forte homologie de séquence de 60,9% entre le lysozyme humain et le HEL dans sa forme mature et les structures sont considérées comme très similaires suggérant la possibilité d'épitopes communs. Il est donc important de rechercher une réactivité croisée entre rhuL et HEL.

La spécificité des IgEs au HEL a été démontrée par une inhibition de l'ELISA par une préincubation avec HEL pour tous les sérums testés.

La détection d'une réaction croisée entre rhuL et HEL a été étudiée par l'inhibition d'ELISA par rhuL. Aucune inhibition par rhuL n'est obervée aux mêmes concentrations que HEL Des taux de 1000 à 10000 fois supérieurs doivent être utilisés pour observer une inhibition sur seulement 4 sérums.

L'étude de l'allergénicité de rhuL et HEL par le BAT montre un taux de 58% de BAT positifs au HEL et de 74% au rhuL avec une concordance de 82% des résultats entre les deux produits. Ces résultats suggérent soit une réactivité croisée des produits au niveau des IgE présentes à la surface des basophiles soit une activation non spécifique des basophiles par rhuL.

Deux BAT ont été positifs avec le lysozyme de lait d'origine humaine (BML). Les basophiles testés provenaient d'enfants présentant par ailleurs une sensibilité aux protéines de lait de vache. Les BAT positifs peuvent être dus à la présence de résidus d'autres protéines de lait dans le BML utilisé, protéines qui peuvent présenter une réactivité croisée avec certaines protéines de lait de vache.

Tous les autres BAT au BML ont été négatifs. Il apparaît donc qu'il n'existe pas de réaction croisée entre lysozyme humain natif (BML) et HEL mais qu'en revanche rhuL et HEL provoquent in vitro, de façon quasi similaire, la dégranulation des basophiles.

Une étude complémentaire in vivo comparant TPO à HEL et à rhuL pourrait être utile à la compréhension des résultats contradictoires obtenus *in vitro*.

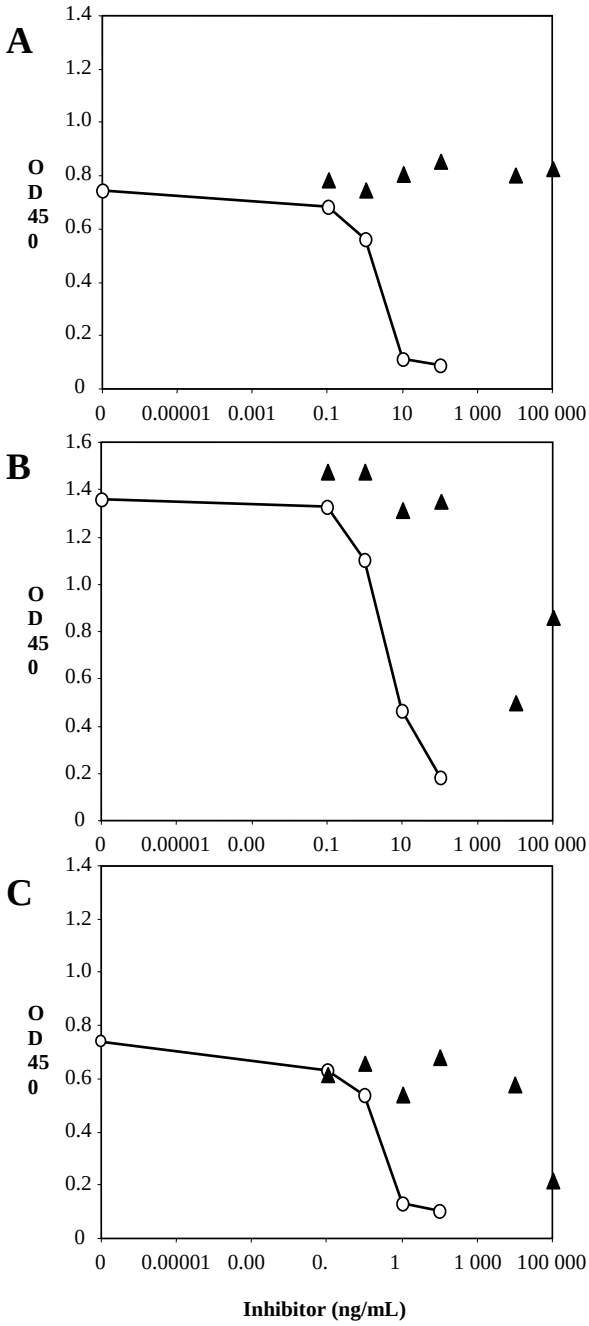


Figure 19 : Inhibition d'ELISA après préincubation (○) avec HEL, (▲) avec rhuL. (A) aucune inhibition ; (B&C) inhibition avec des taux de 10 000 et 100 000ng/ml de rhuL.

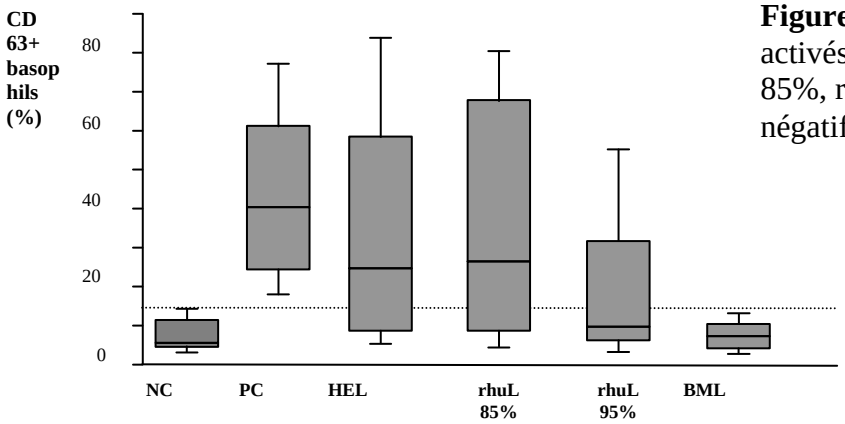


Figure 20 : BAT : Pourcentage de basophiles activés CD63+ après activation par HEL, rhuL 85%, rhuL 95% et BML. (NC) : contrôle négatif ; (PC) : contrôle positif.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La prévalence de l'allergie alimentaire est en constante augmentation pourtant ses mécanismes étiologiques restent non élucidés. Elle résulte de la rencontre ratée entre un individu et un aliment. Chacun des acteurs de cette rencontre met en jeu des paramètres qui lui sont propres et cet ensemble déclenche la maladie allergique.

Différentes caractéristiques distinguent le patient allergique du sujet sain. Un certain nombre de mécanismes cellulaires et leur régulation sont décrits dans le cadre de l'allergie. Les mécanismes cellulaires de l'hypersensibilité de type I sont connus et bien décrits. Plus récemment le déséquilibre de la balance Th1/Th2 a été associé à l'atopie mais ce mécanisme bien que très intéressant à connaître n'est pas spécifique de l'allergie alimentaire. Des facteurs environnementaux d'ordre infectieux (infections virales, flore intestinale) ou liés à la pollution (particules diesel) sont proposés dans le déclenchement de cette pathologie. Probablement la prise de certains médicaments ou d'alicaments peut aussi intervenir dans le déclenchement de la pathologie.

Les habitudes alimentaires et les aliments eux-mêmes ont considérablement évolué au cours de ces dernières décennies. L'évolution de l'alimentation allie une plus grande diversité des produits et de leur origine, une plus large consommation de produits issus de l'industrie alimentaire, une modification des goûts et des choix. Dans le même temps il est observé et décrit une augmentation de la prévalence de l'allergie alimentaire au même titre que d'autres pathologies liées à l'alimentation comme l'obésité, le diabète ou les maladies cardiovasculaires. Il est donc légitime d'envisager une relation étroite et causale entre l'aliment lui-même (et/ou son mode de consommation) et l'augmentation de la prévalence de l'allergie alimentaire.

Alors l'allergène est-il le principal responsable de l'allergie alimentaire ? L'allergène n'a pas de définition biochimique. Les caractéristiques minimales communes aux allergènes sont une nature protéique, une résistance à la protéolyse complète et au traitement thermique. Dans la majorité des cas l'allergène responsable est ingéré.

Les traitements industriels nécessaires à la valorisation des protéines alimentaires peuvent avoir des effets variables sur l'allergénicité des produits. Rarement des néoallergènes sont retrouvés, en revanche certains allergènes majeurs peuvent être dénaturés et d'autres allergènes peuvent être concentrés. De ce fait les études portant sur la modification de l'allergénicité par les traitements industriels ne doivent pas concerner un allergène mais l'ensemble des protéines allergéniques d'un aliment. L'étude poussée de chaque allergène natif et après traitement industriel devrait permettre d'identifier « le plus petit dénominateur

commun » conservé et conférant l'allergénicité à la protéine. Au-delà des techniques électrophorétiques et d'immuno-empreintes largement utilisées dans la reconnaissance de l'allergène responsable il semble nécessaire d'utiliser à présent, de façon plus systématique d'autres techniques de caractérisation chimique, complétant le séquençage de la protéine d'intérêt. La technique de spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier fait partie de ces outils. C'est une technique utilisée déjà largement en milieu industriel et qui présente un avantage majeur par rapport à d'autres techniques séparatives comme la LC/MS, celui de travailler sur tout type d'échantillon sans le détruire. Cette méthode permet d'approcher facilement les structures secondaires des protéines.

Ce schéma d'identification associant électrophorèse, immunoblot voire IRTF peut bien évidemment s'appliquer à tout nouvel aliment ou nouvel ingrédient incriminé dans un processus allergique.

La fabrication des protéines recombinantes fait évoluer actuellement, le diagnostic et l'immunothérapie. La grande supériorité des nouvelles protéines sera d'amener une standardisation des outils diagnostiques in vivo et in vitro et ainsi d'approcher des chiffres de prévalence plus justes et répétables. De plus la possibilité de fabriquer à façon des protéines et de les associer entre elles dans des mélanges plus ou moins complexes permettra probablement d'étudier les interactions entre les molécules protéiques, lipidiques et d'évaluer plus aisément les affinités des IgE spécifiques.

La compréhension de la physiopathologie de l'allergie alimentaire, de la structure allergénique d'une protéine nécessite un travail de collaboration étroite entre médecins, biochimistes, immunologistes et industriels agroalimentaires. La connaissance de la prévalence de l'allergie alimentaire et la découverte d'allergie émergente doit toujours passer par un réseau de veille au travers de réseau d'allergovigilance en association avec les observateurs (économistes et sociologues) de la consommation de l'alimentation.

REFERENCES

Abuaf N, Rajoely B, Ghazouani E, levy DA,, Pecquet C, Chabane H, Leynadier F : Validation of flow cytometry assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of muscle relaxant allergy. J Allergy Clin Immunol 1999. 105: 411-418.

Abuaf N, Rajoely B, Gaouar H, Pecquet C, Leynadier F. Contribution de la cytométrie en flux au diagnostic d'une allergie. Rev franc allergologie Immuno clin 2004. 44 : 37-44.

Akdis M., Blaser K., Cezmi A., Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogeneisi, prevention, and treatment of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol, 2005. 116(5): 961-968.

Akiyama H., Sakata K., Yoshioka Y., Murata Y., Ishihirio Y., Teshima R., Sawada JI., Maitani T. Profile analysis and immunoglobulin E reactivity of wheat protein hydrolysates. Int Arch Allery Immunol 2006. 140: 36-42.

Asensio, T., et al., Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. J Allergy Clin Immunol, 2004. 114(4): 896-9.

Asero R., et al. IgE-mediated food allergy diagnosis: Current status and news perspectives. Mol Nutr Food Res, 2007. 51: 135-147.

Astier C, Morisset M, Roitel O, Codreanu F, Jacquenet S, Franck P, Ogier V, petit N, Proust B, Moneret-Vautrin DA, Burks W, Bihain B, Sampson HA, Kanny G. Predicyive value of skin prick tests using recombinant allergens for diagnosis of peanut allergy. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118: 250-256.

Astwood J.D, Silvanovich A, Bannon GA. Vicilins: A case study in allergen pedigrees. J Allergy Clin Immunol 2002. 110 : 26-7.

Bacchetta R., Gregori S., Roncarolo MG. CD4+ regulatory T cells: Mechanisms of induction and effector function. Autoimmunity reviews, 2005. 4: 491-406

Ballmer-Weber BK, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kündig G, Fötisch K, van Ree R, Viethss S. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure? Clin Exp Allergy,2005. 35: 970-978.

Bannon G., Fu TJ., Kimber I., Hinton DM. Protein digestibility and relevance to allergenicity. Environmental Health Perpect 2003. 111(8): 1122-1124.

Bloedon LT, Balikai S, unnane Sc, berlin JA, rader DJ, Szapary PO. Flaxseed cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. J Am Coll nutr 2008; 27 (1) : 65-74.

Boumiza R, Monneret G, Forissiert MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. Clin Exp Allergy 2003. 33: 259-265.

Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophils activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perpectives. Clin Mol Allergy 2005. 3: 9.

Breiteneder H. Can any protein become an allergen? Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2008. 48 : 135-138

Breiteneder H, Mills ENC. Plant foods allergens - structural and functional aspects of allergenicity. Biotechnol Advances, 2005. 23: 395-399.

Burks AW, Williams LW, Thresher W, Connaughton C, Cockrell G, Helm RM. Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. J Allergy Clin Immunol 1992; 90:889-97.

Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature ant structural biology of allergens. J Allergy Clin Immunol 2007. 119: 414-420.

Charvet JP. L'alimentation dans le monde. 2° édition. Eds Larousse, 2006.

Chehade M., Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115 (1): 3-12.

Chung SY, Butts CL, Maleki SJ, Champagne ET. Linking peanut allergenicity to the process of maturation, curing and roasting. J agric food chem, 2003. 51: 4273-4277.

Crevel, R., Industrial dimensions of food allergy. Proc Nutr Soc, 2005. 64(4): 470-4.

Crevel, R.W., Risk assessment for food allergy--the industry viewpoint. Allergy, 2001. 56 Suppl 67: 94-7.

Davis, P.J., C.M. Smales, and D.C. James, How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? Allergy, 2001. 56 Suppl 67: 56-60.

De La Barca, A.M., A. Wall, and J.A. Lopez-Diaz, Allergenicity, trypsin inhibitor activity and nutritive quality of enzymatically modified soy proteins. Int J Food Sci Nutr, 2005. 56(3): 203-11.

de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanc M, Demoly P, Ebo D, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: More potentials and perspectives than pitfalls. Int Arch Allergy Immunol 2008. 146: 177-189.

Dirks CG, Pedersen MH, Platzer MH, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Poulsen LK. Does absorption across the buccal mucosa explain early onset of food-induced allergic systemic reactions? Allergy Clin Immunol. 2005 Jun;115(6):1321-3

Docena G., Rozenfeld P., Fernandez R., Fossati CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes in vitro tests. Allergy 2002. 57: 83-91.

Dreborg S. Skin test in diagnosis of food allergy. Allergy Proc. 1991 Jul-Aug;12(4):251-4.

Dube, M., et al., Effect of technological processing on the allergenicity of mangoes (Mangifera indica L.). J Agric Food Chem, 2004. 52(12): 3938-45.

Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. Cupins : the most functionally divers protein superfamily? Phytochemistry, 2004. 65 : 7 - 17.

Ebo D, Lechkar B, Schuerwegh A, Bridts C, De Clerk I, Stevens W. Validation of two-color flow cytometric assay detecting in vitro basophil activation for the diagnosis of IgE-mediated natural rubber latex allergy. Allergy 2002. 57: 706-712.

Ebo D, Hagendorens M, Bridts C, Schuerwegh A, 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 2005. 54B: 28-33.

Ebo D, Sainte-Laudy J, Bridts C, Mertens C, Hagendorens M, Schuerwegh A, De Clerck L, Stevens W. Flow-assisted allergy diagnosis: curent applications and future perspectives. Allergy 2006. 61:1028-1039.

Ehn BM., Allmere T., Telemo E., Bengtsson U., Ekstrand B. Modification of IgE binding to beta-lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. J Agric Food Chem, 2005. 53(9):3743-3748.

Fiocchi, A., et al., Clinical tolerance of processed foods. Ann Allergy Asthma Immunol, 2004. 93(5 Suppl 3): S38-46.

Fiocchi A, Restani P, Riva E, Mirri GP, Santini I, Bernardo L, Galli CL. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. Allergy. 1998 Aug;53(8):798-802

Fötisch K, Altmann F, Haustein D, Vieths S: Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. Int Arch Allergy Immunol 1999; 120: 30-42.

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

Gruber P, Becker WM, Hofman T. Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut 'Arachis hypogaea), ist majors epitopes, and peanut agglutinin. J agric food chem, 2005. 53: 2289-2296.

Gutierrez-Gomez V, Fournier C, sauvage C, Vilain AC, Just N, Wallaert B. Réactions anaphylactiques induites par l'inuline. Rev Franc Allerg Immunol clin 2005. 45: 493-495.

Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Lüttkopf D, Skov PS, Wüthrich B, Bindslev-Jensen C, Vieths S, Poulsen LK.Roasted hazelnuts--allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. Allergy. 2003 Aug;58(8):727-9.

Hermans D. Aspects cliniques de l'allergie alimentaire du jeune enfant. Louvain médical 2005.9: S214-S219.

Howell WM., Turner SJ., Hourihane JOB., Dean TP., Warner JO. HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic asociations with peanut allergy : evidence from a family-based and cae-control study. Clin exp allergy, 1998. 28:156-162.

Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk A: In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. Allergy 2006; 61:1220-9.

Jutel M., Akdis M., Blaser K., Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy - T-cell tolerance and more. Allergy, 2006. 61 : p.796-807.
Kleine-Tebbe J, Erdmann S, Knol EF, MacGlashan DW, Poulsen LK, Gibbs BF. Diagnostic tests based on human basophils: Potentials, pitfalls and perspectives. Int Arch Allergy Immunol 2006. 141: 79-80.

Kobayashi, M., hashimoto, Y., Taniuchi S., TanabeS. Degradation of wheat allergen in japanese soy sauce. Int J Mol Med, 2004. 13(6): 821-827.

Kopper RA, Odum NJ, Sen M, Helm RM, Stanley JS, Burks AW. peanut protein allergens: the effect of roasting on solubility and allergenicity. Int arch allergy immunol, 2005. 136: 16-22.

Lambert C, Guilloux L, Dzviga C, Gourgaud-Massias C, Genin C. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom. Cytometry B Clin Cytom 2003. 52: 13-19.

Lamblin F, Hano c, Fliniaux O, Mesnard F, Fliniaux MA, Lainé E. Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement des cancers. Med Sci 2008; 24(5): p. 511-520
Lee HW., Keum EH., Lee SJ., Sung DE., Chung DH., Lee SI., Oh S. Allergenicity of proteolytic hydrolysates of soybean 11S globulin. J Food Sc 2007. 72(3): C168-C172

Lehrer SB, Reese G. Recombinant proteins in newly developed foods: identification of allergenic activity. 1997; 113: 122-124.

Lehrer, S.B. and G.A. Bannon, Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality. Allergy, 2005. 60(5): 559-64.

León F, Rodríguez M, Cuevas M.The major allergen of linseed. Allergy. 2002 Oct;57(10):968.

Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccahrides and other prebiotic. J appl microbiol 2008; 104:305-344

Malandain H, Lavaud F. Allergénicité des protéines de défense végétale. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2004. 44: 469-475.

Malandain H: IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact. Allerg Immunol 2005; 37: 122-8.

Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP.The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J Allergy Clin Immunol. 2000 Oct;106(4):763-8.

Maleki, S.J., Food processing: effects on allergenicity. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. 4(3): 241-5.

Mari A: IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. Int Arch Allergy Immunol 2002; 129:286-95.

Matsuda, T., T. Matsubara, and S. Hino, Immunogenic and allergenic potentials of natural and recombinant innocuous proteins. J Biosci Bioeng, 2006. 101(3): 203-11.

Meredith, C., Allergenic potential of novel foods. Proc Nutr Soc, 2005. 64(4): p. 487-90.
Metcalfe, D.D., et al., Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996. 36 Suppl: S165-86.

Mills ENC, mackie AR, Burney P, Beyer K, Frewer L, madsen C, Botjes E, Crevel RWR, Van Ree R. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. allergy, 2007. 62: 717-722.

Mondoulet, L., Paty E, Drumare MF, Ah-Leung S, Scheinmann P, Willemot RM, Wal JM, Bernard H., Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. J Agric Food Chem, 2005. 53(11): 4547-53.

Moneret-Vautrin, D.A., Modifications of allergenicity linked to food technologies. Allerg Immunol (Paris), 1998. 30(1): 9-13.

Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Morisset M. Les allergies alimentaires de l'enfant et de l'adulte. Eds Masson, Paris, 2006.

Moneret-Vautrin D.A. Epidémiologie de l'allergie alimentaire. Rev franc allerg immunol clin, 2008. 48: 171-178

Monneret G, Benoit Y, debard AL, Gutowski MC, Topenot I, Bienvenu J. Monotoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allaergy to muscle relaxant drugs. Clin Immunol, 2002. 102: 192-199.

Morisset M, Codreanu F, Astier C, Olivier R, Jacquenet S, Bihain B, Moneret-Vautrin DA, Kanny G. Intérêt des allergènes recombinants dans le diagnostic de l'allergie alimentaire. Rev Allerg Immunol Franç, 2008. 48: 242-245.

Nieuwenhuizen N, Lopata AL. Fighting food allergy. Current Approaches. Ann N.Y. Acad Sci 2005. 1056 : 30-45.

Nowak-Wegrzyn, A. and H.A. Sampson, Adverse reactions to foods. Med Clin North Am, 2006. 90(1): 97-127.

Oehlschlager, S., et al., Food allergy--towards predictive testing for novel foods. Food Addit Contam, 2001. 18(12): 1099-107.

Patade A, Devareddy L, lucas EA, Korlagunta K, Daggy BP, Arjmandi BH. Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in Native American postmenopausal women. J Women Health, 2008. 17(3): 355-66

Pauli G, Metz-Favre C, Fontaine JF. Allergènes recombinants croisant avec les allergènes de pollen. Rev Franç Allerg Immunol, 2006. 46:153-157.

Peñas E, Restani P, Ballabio C, Préstamo G, Fiocchi A, Gomez R. Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. J Food Prot. 2006 Jul;69(7):1707-12.

Platz I, Binder M, Marxer A, Lischka G, Valent P, Burhing HJ. Hymenoptera venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyro-phosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. Int Arch Allergy Immunol, 2001.126: 335-342.

Poms, R.E. and E. Anklam, Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. J AOAC Int, 2004. 87(6):1466-74.

Poulsen LK. In search of a new paradigm: mechanisms of sensitization and elicitation of food allergy. Allergy 2005. 60 : 549-558.

Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils and eosinophils. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111: S486-S494.

Radauer C, Breiteneder H. evolutionary biology of plant food allergens. J Allergy Clin Immunol, 2007. 120: 518 - 525

Régnier F, Lhuissier A, Gojard S. Sociologie de l'alimentation. Collection Repères. Eds La Découverte, Paris, 2006.

Reuter A, Lidholm J, Andersson K, Östling J, Lundberg M, Scheurer S, Enrique E, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncin M, Ballmer-Weber BK, Vieths S. A critical assessment of allergens component-based in vitro diagnosis in cherry allergy across Europe. Clin Exp Allergy, 2006. 36: 815-823.

Romagnani S. Immunologic influences on allergy and Th1/Th2 balance. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113 (3): 395-400.

Romagnani S. Regulatory T cells : which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders. Allergy, 2006. 61: 3-14.

Romagnani S. Regulation of the T cell response. Clin exp allergy, 2006. 36 : 1357-1366.

Rona, RJ, Keil, T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergr E, Sigurdartottir ST, Lindner Y, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prévalence of food allergy: A meta-analysis. J Allergy Clin Immunol, 2007. 120 : 638-646.

Rosendal A. Barkholt. Detection of potientially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. J Dairy Sci, 2000. 83(10): 2200-2210.

Saintelaudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M. Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. Clin Exp Allergy, 2000. 30: 1166-1171.

Sanchez C, Fremont S. Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. Rev franc allergologie immunol clin, 2003. 43: 13-20.

Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S, Gonzalez-Mancebo E, Fernandez-Rivas M, van Ree R, Mills ENC. The effect of thermal processing on the Ige reativity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. Allergy, 2005. 60: 1262- 1268.

Seabourn BW, Chung OK, Seib PA, Mathewson PR. Determination of secondary structural changes in gluten proteins during mixing using Fourier transform horizontal attenuated total reflectance spectroscopy. J Agric Food Chem, 2008. 56: 4236-4243.

Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, 9. Food allergy. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(2 Suppl Mini-Primer): S470-5.

Steckelbroeck S, Ballmer-Weber B, Vieths S. Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. J Allergy Clin Immunol 2008. 121: 1323-1330.

Steinke JW., Rich SS., Borish L. Genetics of allergic disease. J Allergy Clin Immunol, 2008. 121: S384-S387.

Sudheer PS, Hall JE, Read GF, Rowbottom AW, Williams PE. Flow cytometric investigation of per-anesthesic anaphylaxis using CD63 and CD 203c. Anaesthesia 2005. 60: 2516 - 256.

Taylor, S.L., Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: 99-112.

Taylor, S.L., Review of the development of methodology for evaluating the human allergenic potential of novel proteins. Mol Nutr Food Res, 2006. 50(7): 604-9.

Taylor, S.L. and S.L. Hefle, Will genetically modified foods be allergenic? J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(5): 765-71.

Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, Bannon G, Cockburn A, Crevel R, Fitzpatrick J, Mills C, Privalle L, Vieths S. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. Food chem Toxicol, 2007. 45: 1116-1122.

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: 150-151.

Untersmayr E., Jensen-Jarolim E. Mechanisms of type I food allergy. Pharmacol therap, 2006. 112 : 787- 798.

Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr W, Bürhing HJ, Valenta R. Assays for measuring in vitro basophils activation induced by recombinant allergens. Methods 2004. 32: 265-270.

Van Boxtel EL, Vanden Broek LA, Koppelman SJ, Gruppen H. Legumin allergens from peanuts and soybeans: effect of denaturation and aggregation on allergenicity. Mol nutr foods res, 2008: 52: 674-682.

van der Veen MJ, van Ree R, Aalberse RC, Akkerdaas J, Koppelman SJ, Jansen HM, van der Zee JS: Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: 327-34.

van de Weert M, Haris PI, Hennink WE, Crommelin DJA. Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors. Anal Biochem,2001. 297: 160-169.

van Ree et al. The CREATE project: development of certified refernce materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. Allergy,2008. 63: 310-326.

Vieths, S., et al., Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. Allergy, 1998. 53(46 Suppl): 65-71.

Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B: Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. Ann N Y Acad Sci 2002; 964: 47-68.

Vila H, Beyer K, Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. Clin Exp Allergy, 2001. 31: 1599-1606.

Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis - The epidemiological evidence. Immunobiology, 2007. 212: 433-439.

Wal JM. Thermal processing and allergenicity of foods. Allergy, 2003. 58: 727-729.

Wal JM. Allergies alimentaires: mécanismes physiopathologiques, identification des allergènes alimentaires. Nut Clin Met, 2004. 18: 15-19

Yamanishi R, Tsuji H, Bando N, Nadaoka Y, Nishikawa K, Emoto S, Ogawa T. Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases. J Nutr Sci Vitaminol 1996; 42: 581-587.

Zhang W, Wang X, liu Y, Tian H, Flickinger B, Empie MW, Sun SZ. Effects of dietary flaxseed lignan extract on symptoms of benign prostatic hyperplasia. J Med Food 2008.

Zhu J., Yamane H., Cote-Sierra J., Guo L., Paul WE. GATA - 3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. Cell research, 2006. 16 :3-10.

ANNEXE 1

PUBLICATIONS PRESENTEES DANS L'OUVRAGE

Les publications et manuscrits soumis, présentés dans le travail de thèse sont rassemblés dans cette annexe. Les textes intégraux, les tableaux et figures sont tous colligés.

Introduction

Flax (*Linum usitatissimum*) is a plant that belongs to the Linaceae family. Flaxseeds are rich in oil (30 to 45%) and particularly in polyunsaturated omega-3 fatty acids. They contain 25% proteins, raw fibres (25%), mucilage (3 to 10%) and mineral substances (3 to 5%) (1). Its use as a functional food is envisaged (2)

Flax is cultivated for textiles fibres and its seeds are used in different way: animal feeding, oil, laxative preparations and for special bakery goods. They have been introduced into health-products and standard foodstuffs: bread, toasts, mix of breakfast cereals. Consumption of flax proteins tends to increase and could constitute a new risk of allergy.
We report two rare cases of severe anaphylactic reaction to flaxseeds after consumption of a laxative and bakery goods.

Material and methods

Patients:

Two patients presenting an anaphylactic reaction after consumption of linseed were studied.

Patient A

A 41-year-old woman took a drug preparation composed of ground linseed as a laxative. Fifteen minutes after the intake of two "sachets" of Mucivital® (Arkopharma, France), corresponding to 13 g of ground linseed, she experienced laryngeal oedema associated with generalized urticaria and abdominal pain. She was treated by adrenalin and prednisolone.

Her past history was characterized by an asthma and atopic dermatitis, pollinosis. She presented a polysensitization to multiple aeroallergens and food allergens. She was sensitized to dust mite, to birch, graminaceae and ash tree pollens, to cat, dog and horse dander. She had also an allergy to latex and a food allergy to wheat, milk, egg and sesame.

Patient B

A 34-year-old woman, seller in a bakery, experienced urticaria and rhinitis after the consumption of special bread containing linseed. She manipulated daily bakery goods containing linseed.

She had presented an anaphylactic shock due to buckwheat contained in a pancake. She presented also food allergies to sesame and hazelnuts. She had a rhinitis with a sensitization to dust mite, dog dander and alternaria.

Skin prick-test (SPT)

SPT were carried out with four different products derived from linseed: crushed linseed produced by organic agriculture, flaxseeds flour composing Mucivital® (Arkopharma, France), heated flaxseeds and texturized flaxseed protein obtained from an agroalimentary industry (Valorex, France), ground in saline according to the technique of prick-in-prick (3).

The positive control was codein phosphate 9%. The negative control was saline. The criterion for positivity was a wheal diameter greater than 75% of the positive control.

Food challenge

The double blind placebo controlled food challenge (DBPCFC) was performed as previously described (4,5). Briefly, the progression increased up to a cumulative dose of 965 mg. The vehicle used was stewed apples and the placebo material was crushed dried brown toast. The double blind placebo controlled food challenge

(DBPCFC) was only performed on patient A, as patient B declined the realisation of this oral challenge test.

Determination of specific IgE

The patients' specific IgE levels were determined by using the Immuno CAP Assay IgE to linseed (Pharmacia, Sweden). Levels of specific IgE of greater than 0.35 kUI/l were considered positive.

Preparation of linseed extracts

Buffer extract

We studied three manufactured products derived from linseed: heated flaxseeds and texturized flaxseeds protein (Valorex), flax flour obtained by grinding seeds (Mucivital, Arkopharma, France). We suspended 50 mg of flour, heated or texturized protein in 5 ml of pH 8 buffer (0.1 M Tris, 0.14 M NaCl, 2mM EDTA, 0.05% Triton, 0.05% deoxycholate and 0.1% nonidet P40) by an overnight incubation with shaking at 4°C. The suspension was ultracentrifuged for 15 minutes at 17,000 rpm and then filtered. The protein content of the extracts was determined with the pyrogallol red method.

SDS-PAGE and immunoblotting

Extracts were heated at 100°C for 10 minutes in a classic denaturing buffer (2.5% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol). Electrophoresis was carried out in a PhastSystem (Pharmacia) with a 10-15% polyacrylamide gradient gel (Pharmacia). We loaded the equivalent of 4 µg of protein for each extract. A molecular weight standard composed of biotinylated proteins (Covalab, Dako) was also run on the gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to a cellulose membrane with 0.45 µm pores. The membrane was then saturated by incubation in 5% bovine serum albumin (BSA), 0.05% Tween in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour, followed by an overnight incubation at 4°C in a 1:5 dilution of the serum to be tested in 1% BSA, 0.05% Tween. The membrane was washed four times in 0.05% Tween in PBS and was then incubated for 1 hour at room temperature in a 1:10000 dilution of peroxidase-conjugated human anti-IgE antibody (Dako) in 1% BSA, 0.05% Tween in PBS. The membrane was washed four times and then immersed in a solution of luminol in the presence of H_2O_2 (Covalab, Dako) directly on a Kodak Digital Science 1D image analyser. An image was acquired, with an exposure time of 6.6 minutes (20 captures).

The membrane was then incubated for 15 minutes in the presence of peroxidase-conjugated avidin (diluted 1:2000). Then follows the detection procedure described above, to visualize the molecular weight standards in order to determine the molecular weight of the observed bands.

A negative control immunoblot (serum replaced by 1% BSA) was carried out in strictly identical conditions to ensure that there was no non-specific binding of the secondary antibody. Sera from two non allergic patients were also tested as negative control.

Results

Skin-prick-tests

Patient A

Prick tests SPT were positive to ground linseed (10.5 mm), flaxseeds flour composing Mucivital® (9.5 mm), heated flaxseeds (15.5 mm) and texturized flaxseeds protein (13.5 mm). SPT to codein phosphate 9% is at 3 mm with a negative saline control.

Patient B

Prick tests SPT were positive to ground linseed (30 mm). SPT to codeine phosphate 9% is at 3 mm with a negative saline control.

Food challenge

The double blind placebo controlled food challenge (DBPCFC) was positive at the dose of 265 mg with occurrence of generalized urticaria and abdominal pain.

Determination of specific IgE

The specific IgE level was 0.51 kUI/l for patient A and 1.7 kUI/l for patient B.

SDS PAGE

The electrophoretic profiles (Figure 1) of the buffer extracts of the three products were very similar. The major proteins were 9, 23 and 31 kDa in size and an additional protein with a molecular weight of 50 KDa in ground seeds extracts.

Immunoblotting

The BSA control showed negative results. Immunoblot with flax flour revealed the presence of an allergen, 30 kDa in size, which reacts with IgE of the patient A serum (figure 2). No specific IgE binding with a linseed protein was shown with patient B serum.

Discussion

These two cases confirm the particular allergic risk of flaxseeds. We point out that flaxseeds can be ingested either in pharmacy as a laxative, or in bakery. Rare cases of anaphylaxis to flaxseed have been reported in literature until now: two cases with linseed used as a laxative, and two other cases after consumption of bread containing several seeds, confirmed by skin-prick-test and by the presence of specific IgE (8,9).

Allergenicity of flax proteins is not studied a lot. We studied three different flaxseed-derived products. Heating and texturization do not modify the electrophoretic profiles and do not enhance the allergenicity of the flaxseeds proteins. We identified an allergen in patient A with a molecular weight of 30 kD quite similar than this identified by Leon et al (7). Alonso et coll identify several allergens of 38, 35, 30, 22, and 20 kDA (10). Lezaun et coll. showed that the reducing treatment of the flaxseeds extracts modify the detected bands: several low-intensity bands between 35 and 100 kDA in reducing conditions and from 150 to 175 kDA in non-reducing conditions (8). Leon et coll observe a real difference between allergens identified by reducing treatment, or not. The β-mercaptoethanol-reduced main allergen identified by western blotting had a molecular weight of 28 kDA whereas the non reduced extract revealed specific reactivity at 56 kDa (4,5). The implicated allergen (30 kDa) might be a dimer, consisting of monomers bound by SH_2 groups. A candidate might be the malate deshydrogenase MDH-1 (11)

It is then surprising, to detect a very low rate of specific IgEs for the two patients though the clinical history is severe, prick-tests are really positive, and the reactogenic threshold is weak. Moreover, we do not identify allergenic proteins for patient B in immunoblot. This leads us to suggest that this allergen is hydrophobic. In fact, linseeds are ground in a buffer. The hydrophobic allergens would be insoluble in this buffer and then not detected. It could correspond to an oleosin. This could explain the negativity of biological tests using extracts that may lack hydrophobic allergens.

References

1. Wichtl M, Anton R. Graines de lin. In: Doc T, editor. Plantes thérapeutiques. Paris; 1999.

2. Oomah BD. Flaxseed as a functional food source. J Sci Food Agric 2001;81:889-894.

3. Dreborg S. Skin tests in diagnosis of food allergy. Allergy Proc 1991;12:251-254.

4. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Beaudouin E, Morisset M. Méthodologie des tests de provocation orale standardisés à double insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire. Revue de la littérature et expérience du service de médecine interne, immunologie clinique et allergologie de Nancy. Rev Fr Allergol 2000;40:237-250.

5. Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guénard L, Beaudouin E, Flabbee J, 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;33:1046-1051.

6. Lack G. Clinical risk assessment of GM foods. Toxicol Lett 2002;127:337-340.

7. Leon F, Rodriguez M, Cuevas M. The major allergens of linseed. Allergy 2002;57:968.

8. Lezaun A, Fraj J, Colas C, Duce F, Dominguez MA, Cuevas M, et al. Anaphylaxis from linseed. Allergy 1998;53:105-106.

9. Leon F, Rodriguez M, Cuevas M. Anaphylaxis to Linum. Allergol Immunopathol (Madr) 2003;31:47-49.

10. Alonso L, Marcos ML, Blanco JG, Navarro JA, Juste S, Del Mar Garcés M, et al. Anaphylaxis caused by linseed (flaxseed) intake. J Allergy Clin Immunol 1996;98:469-470.

11. Fieldes MA, Dixon B. Malate dehydrogenase isozymes in flax genotroph leaves: differences in apparent molecular weight and charge between and within L and S. Biochem Genet 1998;26:249-260.

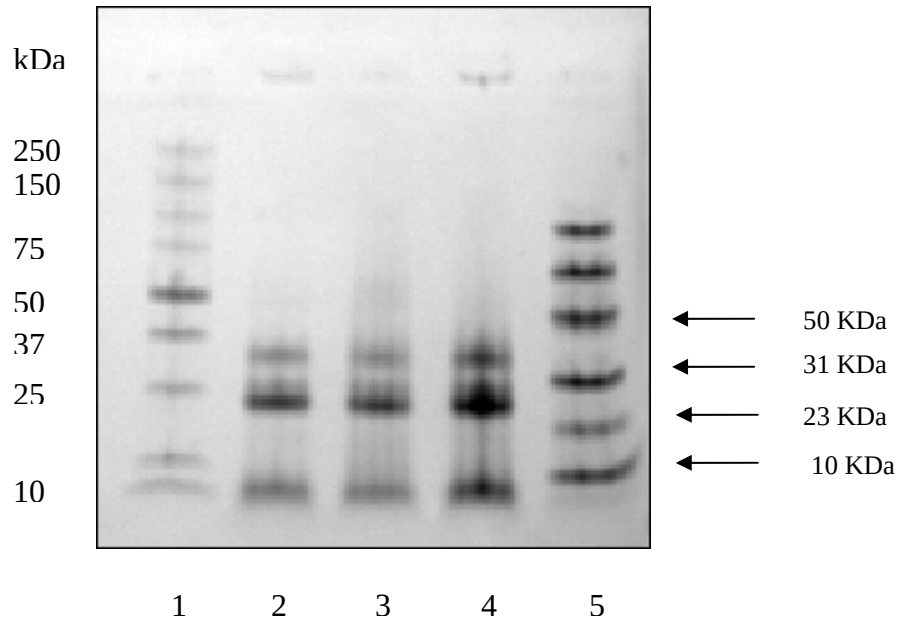


Figure 1: SDS-PAGE of various proteins extracts, stained with Coomassie brillant blue.

1,5) Molecular mass standard, 2) Flax flour, 3) Heated flaxseeds protein, 4) Texturized flaxseeds protein

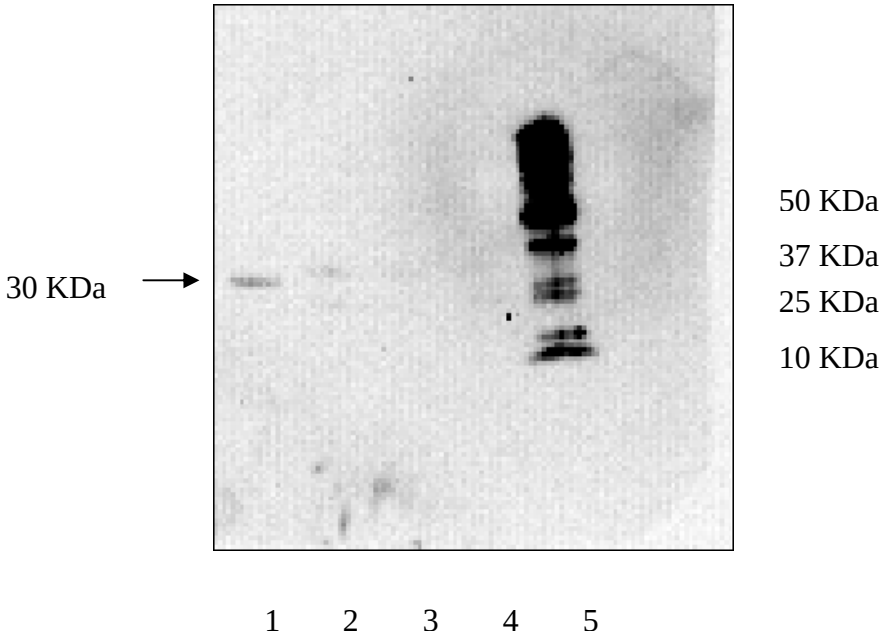


Figure 2: Immunoblot carried out with patient A serum: after protein transfer, the membrane was incubated with serum diluted 1:5. Detection by chemiluminescence on a Kodak 1D digital Science image analyszer; the membrane was then incubated with avidine peroxydase in order to visualize the molecular weight standard.

1) Flax flour, 2, 3) Heated flaxseeds protein, 4) Texturized flaxseeds protein, 5) Molecular mass standard.

S. FREMONT, D.A. MONERET-VAUTRIN, P ; FRANCK, M. MORISSET, A. CROIZIER , F. CODREANU, G. KANNY. **PROSPECTIVE STUDY OF SENSITIZATION AND FOOD ALLERGY TO FLAXSEED IN 1,317 SUBJECTS.**

Soumis à : Allergy

ABSTRACT

Background: Foods containing flaxseed proteins rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) are new on the market, and food allergy to flaxseed remains poorly documented.

Method: In a population of patients attending the allergology department, we used the following methods to evaluate the frequency of sensitization to flaxseed, characterize allergens and look for modifications related to industrial processing: prick-in-prick (PIP) tests, prick tests to standard airborne and food allergens, SDS PAGE, immunoblots, immunoblot inhibition and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometry. Natural and heated then extruded flaxseed were tested.

Results: PIP were positive in 5.8% of the 1,317 patients. 0.15% of this population presented with food allergy to flaxseed. All subjects were atopic and polysensitized. There was cross-reactivity with five other seeds and rape pollen. Immunoblot inhibition confirmed the presence of specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants (CCD). The clinically relevant allergens present in industrial products had molecular weights between 25 and 38 kDa. FTIR spectrometry showed major modifications in β and α structures following industrial processing.

Conclusion: Positive prick tests to natural flaxseed were mainly cross-reactions. Flaxseed food allergy was rare and required PIP to industrial products only. Potential increase in consumption requires monitoring of clinical risk.

INTRODUCTION

Food allergy is a public health issue and any new food appearing on the market should be carefully monitored. Amongst health foods, omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have a preventive effect on cardiovascular disease. Flaxseed contains PUFA. PUFA exert a protective role in atopic dermatitis and reduce the prevalence of atopy [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Flaxseed given to horses with *Culicoides species* sensitivity significantly reduced the size of prick test wheal areas [7].

The recommended ratio of omega 6/omega 3 is around 1/5, but this is not obtained and other sources of supplementation are investigated, either of animal origin: fish (particularly sardines and tuna), or of vegetable origin (rape oil, olive oil, blackcurrant seed oil, etc.) [8]. A current strategy is to add varieties of flaxseed *(Linum usitatissimum)* rich in omega 3 into cereals. Detoxified flaxseed flour is now used in human

food, but there are few data concerning the risk of food allergy. Only a few cases of food allergy with flaxseed or to flaxseed oil used as a laxative have been published [9, 10, 11, 12].

It would therefore seem useful to envisage allergic risk related to novel food, such as that reported for the Micronesian nut Nangai (*Canarium indicum*) [13].

The primary objective of this study was to evaluate the prevalence of sensitization and allergy to natural flaxseed flour in 1,317 patients consulting for diverse allergic disorders. The secondary objectives were to study cross reactivity of flaxseed with other seeds (soybean, lupine, rape) and to compare sensitization to natural flaxseed with flaxseed found in food after transformation by two industrial methods: heating (heated flaxseed) then extrusion (extruded flaxseed).

MATERIAL AND METHODS

Studied population

The prospective study was conducted over 18 months in 1,317 patients attending the allergology department (Internal Medicine, Clinical Immunology and Allergology, Nancy University Hospital Center). They were routinely interviewed to detect possible food allergy to flaxseed and underwent prick tests to 12 standard airborne allergens if they suffered rhinitis and/or asthma, and to 12 standard airborne allergens and to 26 standard food allergens when food allergy was suspected. PIP to crushed flaxseed was added to these tests, with informed consent.

There were two groups:

One group comprised 713 atopic patients with atopic dermatitis, food allergy, allergic rhinitis or allergic asthma, confirmed by prick tests with at least one reference airborne or standard food allergen. Western blot analysis was performed for one patient (case 1) who was sensitized to flaxseed proteins (specific IgE: 8.5 kU/L).

The second group comprised 603 non-atopic patients and included people consulting for allergy to *Hymenoptera*, drug-related adverse reactions, non-allergic rhinitis and some with no history of atopy and negative prick tests to 12 standard airborne allergens. Western blot analysis was performed for one patient (case 2) allergic to flaxseed (flaxseed specific IgE: 11 kU /L).

Prick tests

Skin reactivity was assessed by prick tests to 9% codeine; saline solution was the negative control. The 12 standard airborne allergens were: *D. pteronyssinus*, cockroach, *Alternaria alternata*, cat and dog epithelia, latex, grass pollen, birch pollen, artemisia pollen, plantain pollen, ash pollen, rape pollen (extracts from Allerbio, Varennes en Argonne, France). The 26 standard food allergens tested using PIP [14] were: milk, egg, fish, wheat flour, rye, baker's yeast, peanut, soybean, sesame, buckwheat, shrimp, crab, almond, hazelnut, walnut, peas, banana, beef, chicken, pork, corn, garlic, onion, mustard, potato and tomato.

The flaxseed was from an organic health food shop that guaranteed the absence of pesticides and other products used in traditional agriculture. They were stored at -80°C. After heating to room temperature, they were ground to powder and mixed into a saline solution. Flaxseed flour was supplied by Valorex (35210 Combourtillé, France). It contained eight varieties of *Linum usitatissimum*. Seeds were steamed at a temperature not exceeding 100°C. Extruded flaxseed was obtained from heated flaxseed that had been processed in an extruder (patented manufacturing technique). These products are already found in human food.
Seven patients consented to undergo PIP to heated flaxseed flour from Valorex and to extruded flaxseed flour.

Specific IgE
Specific Ige were assayed using Cap System (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Tests were performed on sera remaining from the blood samples from 26 patients with positive prick tests.

Preparation of protein extract
Seed mixtures were prepared using one gram of seeds ground by Ultraturrax and one ml of buffer pH 8 (0.1M Tris, 0.14 M NaCI, 2 mM EDTA, 0.05% Triton, 0.05% Deoxycholate, 0.1% Nonidet P40). Bromelain extract was prepared by dissolving one gram of bromelain (Sigma, France) in 3 ml of PBS. After incubation overnight at 4°C while shaking, each mixture was centrifuged at 3,500 rpm for 15 min. The protein concentration of the supernatant, measured using the pyrogallol red method, was 10 mg/ml (natural flaxseed), 6mg/ml (heated flaxseed), 3mg/ml (extruded flaxseed), 11 mg/ml (soybean), 5 mg/ml (peanut), 49 mg/ml (lupine), 3 mg/ml (rapeseed), 4 mg/ml (wheat), 39 mg/ml (bromelain). Rapeseed pollen extract was supplied by Allerbio (Varennes en Argonne, France).

RAST inhibition assay
25 µl of serum was incubated with 25 µl of the extracts for 30 minutes while stirring. A control mixture was prepared with 25 µl of serum and 25 µl of PBS. The inhibition percentage was calculated as follows:
1- (cpm bound to inhibiting mixture/cpm bound to control mixture)

Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy
Each type of seed (i.e. natural flaxseed, heated flaxseed, extruded flaxseed) was ground with KBr. Each KBr pellet was analysed using FTIR (Mattson, Unicam). The protein structure was studied by second derivative spectrophotometry between the wave-numbers 1,600 and 1,700 cm^{-1}, corresponding to the absorption domain of the primary amide function of proteins.

SDS-PAGE and immunoblotting
Electrophoresis was conducted as previously described [15]. Briefly, 4 µg of each protein extract (natural flaxseed, heated flaxseed, extruded flaxseed) were denatured and loaded

on an 8-25% polyacrylamide gradient gel (PhastSystem Pharmacia).
A molecular weight standard consisting of biotinylated proteins (Covalab, Dako) was also run on the gels.
After migration, the gel was either stained with Coomassie brilliant blue or transferred to a cellulose membrane with 0.45 µm pores. The Western blot was conducted as previously described (Franck 2002). Briefly, the membrane was incubated at room temperature for 1 hour in 5% bovine serum albumin, washed, incubated overnight with the serum, washed and incubated for 1 hour in a 1:10,000 dilution of peroxidase-conjugated human anti-IgE antibody (Dako) in 1% BSA, 0.05% Tween in PBS. After washing, the membrane was immersed in a solution of luminol in the presence of H_2O_2 (Covalab, Dako) directly on a Kodak Digital Science 1D image analyzer. An image was acquired after an exposure time of 6.6 minutes (20 captures). The membrane was then incubated for 15 minutes in the presence of peroxidase-conjugated avidin (diluted 1:2,000). The revelation was made as described above to visualize the molecular weight standards.

A negative control immunoblot (serum replaced by 1% BSA) was carried out in strictly identical conditions to ensure that there was no non-specific binding of the secondary antibody. Sera from two non-allergic patients were also tested as negative controls.

Immunoblot inhibition

We incubated 500 µl of serum overnight at 4°C in the presence of 500 µl of the protein extract from peanut flour. As described above, an immunoblot was carried out with this preblocked serum. A positive control was conducted using flaxseed extract as an inhibitor.

RESULTS

Clinical data

PIP tests to flaxseed were performed in 714 patients with food allergy or respiratory allergy (360 children aged under 15 years, 354 adults) and in 603 non-atopic patients (213 children, 390 adults). There was 12.2% prevalence of sensitization in atopic children and 8.2% in atopic adults. There was no prevalence in non-atopic children and only 1% prevalence in non-atopic adults (table 1).
Amongst the 77 patients sensitized to flaxseed, 72 were atopic. Two cases of food allergy to flaxseed were diagnosed: one case (case 1) with positive prick test documented by positive double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC) at 265 mg and one case (case 2) presenting recurrent anaphylactic reactions after eating bread containing flaxseed (prick test wheal: 10.5 mm and RAST 11 kU/L). Oral challenges were not performed because of the serious clinical signs. Of 44 children, 39 had food allergy and 31 were sensitive to airborne allergens, including 30 to pollens. Of 33 adults, 10 had food allergy, 21 had respiratory allergy or atopic dermatitis and were sensitive to airborne allergens (including pollens).

A total of 63% of patients sensitized to flaxseed had some kind of food allergy, 67% were sensitized to pollens and 0.15% had food allergy to flaxseed. The study of associated sensitizations in atopic children and adults, sensitized to flaxseed proteins, showed polysensitization to airborne allergens and food allergens in nearly all cases (table 2). Standard airborne allergens were predominant: grass pollen, birch pollen, ash pollen, plantain pollen, artemisia pollen and dog and cat epithelia.

Flaxseed-specific IgE were determined for 26 cases of sensitization detected by PIP. They were present in 16 cases. Amongst these, 14 sera with flaxseed-specific IgE ranging from 1 to 11 kU/L were analysed by RAST inhibition assays with extracts of soybean, peanut, lupine, wheat and rape. Inhibition reached significant levels, up to 78%, and was homogeous for the five seeds tested and for rape pollen (table 3). Out of the 14 sera, 11 had IgE specific to bromelain. Bromelain consistently inhibited flaxseed RAST. In six patients, PIP were performed with natural flaxseed and heated and extruded flaxseed from Valorex. The patient who was allergic to flaxseed was positive to heated and extruded flaxseed, whereas sensitized patients had negative results (table 4). RAST inhibition assay for three types of flaxseed showed significant inhibition for 12/14 sera (table 5).

SDS-PAGE

A similar electrophoresis pattern was observed with the extracts from natural, heated and extracted flaxseed (Figure 1). For each sample, three protein fractions with molecular weights of 14, 25 and 35 kDa were stained.

Western blot

Two sera underwent analysis by immunoblot: serum from a sensitized patient (case 1) (flaxseed-specific IgE at 8.5 kU/l) showed several lanes from 5 to 40 kDa, present in natural and processed flaxseed (heating and extrusion). In extruded flaxseed flour, only one lane of 30-35 kDa appeared (figure 2). The immunoblot from case 2 presenting with food allergy to flaxseed (flaxseed-specific IgE at 11 KU/l) showed two lanes at 25 and 38 kDa (natural flaxseed) and one lane (38 kDa) with heated and extruded flaxseed. Control tests performed using a BSA solution or sera from two non-allergic patients were negative.

Blot inhibition

Incubation of serum with peanut protein extract showed complete inhibition of the blot. The same result was obtained using a protein extract of natural flaxseed, tested as a positive control (Figure 3).

FTIR

Analysis by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrometry showed a modification in the spectrum at the 1650 cm-1 region (alpha structure) and at the 1640 cm-1 and 1620 cm-1 regions (beta structures), after heating. Major changes in alpha structures were observed after extrusion (figure 4).

DISCUSSION

Flaxseed (*Linum usitatissimum*) is a dicotyledon. Although the risk of sensitization has already been reported [16], clinical case reports are rare, and related to other seeds (in bread) or to flaxseed oil used as a laxative [11, 12]. The presence of specific IgE has been demonstrated by RAST confirming positive prick tests [10]. Cases of occupational asthma have been reported [17, 18].

Flaxseed are rich in protein: 20% to 49% of the seed (Viking cultivar). 40% are albumins, 40% are globulins, 6.6% are prolamins and 13.5% are glutelins [19]. The storage proteins are essentially of the legumine family.

Allergenicity to flaxseed has been studied from two cases of allergy to flaxseed, showing reactive lanes at 38, 35, 30, 22 and 20 kDa [11]. Under non-reductor conditions, proteins of 150-175 kDa bind intensly to IgE, showing that there are many potentially allergenic subunits [10, 12]. A 56 kDa allergen was identified in one case and could correspond to the 28 kDa subunit dimer. A malate dehydrogenase would be one candidate [12]. It is possible that the lane we observed at 25 kDa corresponded to this protein.

In this population of 1,317 patients consulting in the allergology department, 5.8% were sensitized to flaxseed. 54% of the 1,317 patients presented with atopic disease (food or respiratory allergy). Extrapolation to the French population, on the basis of an overall rate of 5% to 10% for atopic disease (respiratory allergies, atopic dermatitis, food allergies), produces an estimated prevalence of flaxseed sensitization in the French population ranging from 0.54% to 1.08%. However, allergy to flaxseed is extremely rare (2 cases out of 1,317), corresponding to an estimated 0.01 to 0.02% of the population (1 allergic patient for 6,000 inhabitants).

The frequency of positive prick tests to multiple airborne and/or food allergens indicates possible cross-reactions that would explain positive prick tests to flaxseed. There was marked positivity of RAST inhibition assays with different seeds. There was complete immunoblot inhibition to flaxseed by a peanut extract. This could indicate that part of the cross-reaction is related to the storage proteins that represent a large percentage of the total proteins. However, the frequency of pollen polysensitization and constant flaxseed RAST inhibition by bromelain suggest that cross-reactive carbohydrate determinants (CDD) are involved in cross-reactions. Anti-CCD antibodies are relatively frequent, particularly in patients sensitized to pollen and hymenoptera venom [20, 21, 22]. The clinical relevance of anti-CCD IgE is much discussed [23, 24]. In general, these antibodies do not seem to be involved in food allergy [25]. In sensitized patients, negative PIP tests with heated and extruded products suggest conformational denaturation of these glycosylated proteins. Furthermore, FTIR spectrometry confirmed the profound modification of alpha and beta structures after extrusion.

The patient allergic to flaxseed (case 2) had positive PIP tests with heated and extruded flaxseed, unlike those patients who were merely sensitized. Immunoblot testing performed with this patient's serum confirmed IgE binding to a 38 kDa lane present in both heated and extruded flaxseed. The basis of allergenicity is thus related to thermostable proteins that resist extrusion. This raises the hypothesis of clinically relevant linear epitopes.

To conclude, the relative frequency of skin sensitization, demonstrated by PIP to natural flaxseed, seems to mainly reflect cross-reactivity, and corresponds to allergens that are not clinically relevant. These may be related to CCD in vegetable proteins and/or to homologies between storage proteins in seeds. Only two out of 77 patients with positive PIP to natural flaxseed were allergic. This study indicates that when food allergy to flaxseed is suspected, sensitization investigations should compare natural flaxseed and industrial products found in food. Only positivitity related to industrial products containing flaxseed is correlated to food allergy.
The figures given in this study correspond to a consumption of flaxseed proteins that remains relatively low. Given the nutritional benefits of flaxseed, it is becoming increasingly popular in food preparations, which is why structures like the Allergy Vigilance Network must monitor the potential clinical risk whilst conducting allergenicity studies concerning the different technologies used in the food industry [26].

REFERENCES

1. Yu G, Björksten B: Polyunsaturated fatty acids in school children in relation to allergy and serum IgE levels. Pediatr Allergy Immunol 1998; 9: 133-8.
2. Kankaanpää P, Sütas Y, Salminen S, Lichtenstein A, Isolauri E: Dietary fatty acids and allergy. Ann Med 1999; 31: 282-7.
3. Beck M, Zelczak G, Lentze MJ : Abnormal fatty acid composition in umbilical cord blood of infants at high risk of atopic disease. Acta Paediatr 2000; 89: 279-84.
4. Duchen K, Casas R, Fageras-Böttcher M, Yu G, Björksten B: Human milk polyunsaturated long-chain fatty acids and secretory immunoglobulin A antibodies and early childhood allergy. Pediatr Allergy Immunol 2000;11:29-39.
5. Field C, Clandinin M, Van Aerde J: Polyunsaturated fatty acids and T-cell function: implications for the neonate. Lipids 2001;36:1025-32.
6. Oomah BD: Flaxseed as a functional food source. J. Sci. Food Agric 2001; 81: 889-894.
7. O'Neill W. McKee S, Clarke AF: Flaxseed (*Linum usitatissimum*) supplementation associated with reduced skin test lesional area in horses with Culicoides

hypersensitivity. Can J Vet Res 2002; 66:272-7.
8. Harel Z, Riggs S, Vaz R, White L, Menzies G. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in adolescents: knowledge and consumption. J Adolesc Health. 2001, *28*, 10-15.
9. Stricker WE, Anorve-Lopez E, Reed CE: Food skin testing in patients with idiopathic anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 516-9.
10. Lezaun A, Fraj J, Colás C, Duce F, Domínguez MA, Cuevas M, Eiras P : Anaphylaxis from linseed. Allergy 1998; 53: 105-6.
11. Alonso L, Marcos ML, Blanco JG, Navarro JA, Juste S, del Mar Garcés M, Pérez R, Carretero PJ : Anaphylaxis caused by linseed (flaxseed) intake. J Allergy Clin Immunol 1996; 98: 469-70.
12. León F, Rodríguez M, Cuevas M: The major allergen of linseed. Allergy 2002; 57: 968.
13. 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; 57:398-404.
14. Dreborg, S: Skin tests in the diagnosis of food allergy. Pediatr Allergy Immunol 1995; 6 suppl 8 :38-43.
15. Franck P, Moneret Vautrin DA, Dousset B, Kanny G, Nabet P, Guenard-Bilbaut L, Parisot L: The allergenicity of soybean-based products is modified by food technologies. Int Arch Allergy Immunol 2002; 128:212-9.
16. Grant LR: A report of six cases of flaxseed sensitization with review of the literature. J Allergy 1931; 3: 469-77.
17. Charpin J, Zafiropoulo A, Luccioni R: Occupational asthma in the fat bodies industry. Poumon Coeur 1966; 22: 513-21.
18. Vandenplas O, D'Alpaos V, César M, Collet S, Tafforeau M, Thimpont J: Occupational asthma caused by linseed oilcake. Allergy 2008; 63: 1250-1.
19. Sammour RH: Proteins of linseed (*Linum usitatissimum L.*), extraction and characterization by electrophoresis Bot Bull Acad Sin 1999;40: 121-6.
20. Mari A: IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. Int Arch Allergy Immunol 2002; 129:286-95.
21. Malandain H: IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact. Allerg Immunol 2005; 37: 122-8.
22. Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, Burow G, Hübsch-Müller C, Enk A: In vitro hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and

reciprocal inhibition. Allergy 2006; 61:1220-9.
23. Fötisch K, Altmann F, Haustein D, Vieths S: Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. Int Arch Allergy Immunol 1999; 120: 30-42.
24. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B: Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. Ann N Y Acad Sci 2002; 964: 47-68.
25. van der Veen MJ, van Ree R, Aalberse RC, Akkerdaas J, Koppelman SJ, Jansen HM, van der Zee JS: Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: 327-34.
26. Moneret-Vautrin DA *: Aspects actuels des allergies alimentaires: nécessité d'une allergovigilance.* Bull Acad Natl Med 2001; 185: 943-57 discussion 958-62.

Table 1: Sensitization to flaxseed assessed by PIP

	Non-atopic		Evolutive atopic diseases		**Total**	
	n	sensitized	n	sensitized	n	sensitized
Children	213	0 (0%)	360	44 (12.20%)		
Adults	390	4 (1.02%)	354	29 (8.2%)		
Total	**603**	**4 (0.66%)**	**714**	**73 (10.2%)**	**1317**	**77 (5.84%)**

Table 2: Sensitizations associated to flaxseed sensitization in atopic children and adults

Airborne allergens			**Food allergens**		
	Atopic <15 years	**Atopic >15 years**		**Atopic <15 years**	**Atopic >15 years**
	31	**17**		**42**	**25**
Grass	55%	100%	Pulses	51%	16%
Artemisia	26%	35%	Nuts	76%	32%
Rape	16%	23%	Cereals	16%	40%
Plantain	29%	29%	Egg	38%	12%
Birch	42%	59%	Sesame	16%	20%
Ash	42%	53%	Fish	17%	8%
Alder	3%	0 %	Fruits with cross-reactivity to latex	12%	12%
Hazelnut	3%	0 %	Milk	12%	0
Hornbeam	3%	0	Potato	0	12%

Cypress	3%	0	Mustard	4%	12%
Alternaria alternata	19%	12%	Garlic	2%	12%
Rhizopus	0	6%	Celery	0	12%
Rat	0	6%	Buckwheat	0	8%
Horse	0	6%	Meats	2%	8 %
Dog	32%	53%	Prunoideae	0	8 %
Cat	45%	47%	Tomato	0	4%
Cockroach	6%	6%	Spices	0	8%
D. pteronyssinus	32%	76%	Apiaceae	0	4%
Ficus	6%	12%	Mollusk	2%	0
Latex	0 %	18%	Crustaceans	2%	0

Table 3: Flaxseed RAST inhibition using different extracts of seeds, pollen and bromelain

Patient	Clinical status	Flaxseed PIP (mm)	Sex	Age (years)	Flaxseed RAST (kU/L)	Bromelain RAST (kU/L)	Wheat Inhibition	Peanut inhibition	Rape seed inhibition	Rape pollen inhibition	Soybean inhibition	Lupine inhibition	Bromelain inhibition
1	Peanut allergy	13.5	F	10	10.9	2.02	70%	69%	30%	21%	56%	60%	90%
2					2.9	7.87	70%	62%	35%	40%	60%	60%	85%
3	Peanut allergy	4	M	11	10.9	0.67	34%	54%	57%	48%	30%	42%	89%
4	Peanut allergy	4	M	11	2.22	1.88	65%	62%	49%	47%	35%	48%	90%
5	Cashew allergy	4.5	M	11	2.86	1.11	33%	53%	56%	57%	54%	50%	92%
6	Peanut allergy	2.5	M	11	8.54	1.07	74%	71%	52%	32%	50%	55%	92%
7	Peanut allergy	7	M	6	10	1.5	70%	60%	73%	55%	82%	85%	85%
8	Atopic dermatitis	4	M	3	2.68	< 0.35	51%	57%	60%	40%	63%	60%	80%
9	Atopic dermatitis	5	M	58	7.78	< 0.35	2%	5%	0%	0%	3%	5%	93%
10	Peanut allergy	5	M	11	1.14	1.98	78%	70%	53%	45%	40%	50%	47%
11	What flour allergy (cured)	5	M	12	3.24	7.54	32%	62%	57%	40%	45%	55%	76%
12	Peanut allergy	3	F	6	4.46	< 0.35	61%	68%	55%	41%	56%	62%	91%
13	Peanut allergy	4	M	9	1.4	1.9	45%	55%	55%	39%	50%	53%	75%
14	Peanut allergy	3	M	7	8.06	1.2	55%	62%	50%	35%	55%	60%	92%

Table 4: Compared allergenicity of natural flaxseed, heated flaxseed (Valorex) and extruded flaxseed (Valorex) in an allergic patient (DBPCFC: 265 mg flaxseed) and six sensitized patients (FA: food allergic, S: sensitized)

			PIP wheal diameter (mm)				
Clinical status	Sex	IgE Flaxseed kU/L	Codeine (mm)	Flaxseed (mm)	Natural flaxseed flour (mm)	Heated flaxseed (mm)	Extruded flaxseed (mm)
FA	F	0.51	3	10	10.5	15.5	13.5
S	M	8.8	3	5	6	0.5	0
S	M	3.7	2.5	4	3	1	1
S	F	<0.35	5	3	6	0	0
S	M	<0.35	5	4	5	2	0
S	M	<0.35	1.5	5.5	5	0	0

Table 5: Cross-reactivity evaluated by inhibition of flaxseed RAST by extracts of natural, heated and extruded flaxseed.

	FLAXSEED RAST (kU/L)	NATURAL FLAXSEED INHIBITION (%)	HEATED FLAXSEED INHIBITION (%)	EXTRUDED FLAXSEED INHIBITION (%)
Patients				
1	10.9	63	69	72
2	2.9	60	62	70
3	10.9	41	37	40
4	2.22	62	66	55
5	2.86	14	21	32
6	8.54	60	75	77
7	10	79	90	89
8	2.68	48	49	61
9	7.78	20	30	28
10	1.14	65	74	66
11	3.24	52	59	63
12	4.46	61	65	67
13	1.4	55	59	63
14	8.06	60	63	70

FIGURE LEGENDS

Figure 1: SDS-PAGE (8-25%) of different protein extracts stained with Coomassie brillant blue
Lane 1: standard MWs
Lane 2: natural flaxseed
Lane 3: heated flaxseed
Lane 4: extruded flaxseed

Figure 2: Immunoblot carried out with the serum of a sensitized patient
Lane 1: natural flaxseed
Lane 2: heated flaxseed
Lane 3: extruded flaxseed

Case 1: patient 6, sensitized to flaxseed (RAST 8.5 kU/L)
Case 2: patient with food anaphylactic reaction to bread containing flaxseed (RAST 10 kU/L)

Figure 3: Inhibition of immunoblots conducted with the serum of a sensitized patient (case 1): with or without pre-incubation of serum with a peanut protein extract overnight, and with or without pre-incubation with a protein extract of flaxseed.
Lane 1: extruded flaxseed
Lane 2: natural flaxseed

Figure 4: Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectroscopy
Comparison of transmittance second-derivative spectra in the amide I (1720-1600 cm^{-1}), amide II (1600-1500 cm^{-1}), and amide III (1350-1200 cm^{-1}) regions of natural, heated and extruded flaxseed.

P. Franck, C. Astier, B. Thouvenot, O. Roitel, S. Jacquenet, S.L Taylor, D. Bethell, B.E Bihain, DA Moneret-Vautrin.

Evaluation of the risk of cross reactivity between hen's egg lysozyme and rice originated recombinant human lysozyme, by ELISA and ELISA inhibition tests and basophil activation tests.

Introduction

Lysozyme, or muraminidase, is a phylogenetically ubiquitary enzyme, implicated as an essential component in innate immunity.[1] It exerts a bacteriolytic effect by degrading peptidoglycans constituting the cell wall.[2] Maternal breast milk contains a high amount of lysozyme contributing to the intestinal immunity in infants.[3] The administration of lysozyme to infants has been shown to induce a rise of serum immunoglobulins and of intestinal secretory IgA.[4] Therefore, recombinant human lysozyme (rhuL) is a candidate protein for therapeutic use and for prevention of infectious gastroenteritis in infancy. It has been obtained from various sources: *Aspergillus orizae*, *Saccharomyces cerevisiae*, tobacco, fish, insects, mammals such as mice or goat. A transgenic rice expressing rhuL at a high level is attractive, the more so since rice is a baby food.[5] RhuL expressed in such a rice (*Oryza sativa*, cultivar Taipei 309) represents 2.5% to 4% of total soluble protein, and shows the same molecular mass, isoelectric point and specific activity as native lysozyme.[2] The therapeutical efficiency was documented by a first clinical study in infants with acute gastroenteritis .[6] Prior to more extensive clinical studies, safety tests and efficacy trials need to be conducted according to the recommendations from FAO/WHO.[7-10] Though rhuL can be considered as an autologous self protein, the oral administration may generate a *de novo* allergic risk, on account of a 60.9% sequence identity with hen's egg lysozyme (HEL).[11] Indeed HEL is considered as a major allergen for food allergy and has been also identified as an occupational allergen able to induce respiratory allergy.[12-18] Oral food challenges, inhalation provocation tests and conjunctival tests have established the clinical relevance of HEL sensitization.[15-18] Consequently, the aim of this study is to evaluate cross reactivity of HEL between rhuL produced in transgenic rice, from sera and basophils of egg allergic patients sensitized to HEL using *in vitro* tests ELISA, ELISA inhibition and basophil activation tests (BAT).

Methods

Design of the study

This study includes two parts. The first one was conducted on 60 sera from children allergic to egg (EA children) documented by simple-blind, placebo-controlled food challenge (SBPCFC) to raw egg white. Sera were screened for specific IgEs to hen's egg lysozyme (HEL) by Cap System EIA (Phadia Upsala, Sweden). On the 40 positive sera retained, ELISA tests to HEL with and without inhibition by recombinant purified human lysozyme (rhuL) were realized. Five control sera from children with other food allergies, negative prick tests to egg, negative Cap System, and eating currently egg without symptoms were tested in the same way.

The second part was a prospective study based on sera and basophils from EA children, selected from the pediatric population referred to the Department of

Internal Medicine, Clinical Immunology and Allergology of the Nancy University Hospital for suspected food allergy. Three patients were selected on the basis of positive prick- tests, dosage of specific IgE and DBPCFC to egg, and positive prick test to HEL and/or specific IgEs to HEL. Twenty three were egg allergic and 15 were sensitized to egg with negative DBPCFC. BAT were carried out in all cases and ELISA tests with and without inhibition by rhuL in 22 cases .BAT were carried out in 5 patients without egg sensitization.

Skin prick-tests and oral challenge

Cutaneous tests were carried out according to the prick-in-prick (PIP) method with raw egg and five other foods: milk, fish, wheat or rice, soy, peanut.[19]

A prick test to commercial allergenic extract of HEL (Allerbio®Varennes en Argonne, France) and a PIP to lysozyme powder (food additive used to manufacture cheese obtained from industry) were also performed. Negative control was 9 °/°° saline, and positive control was codeine phosphate 9%. A wheal diameter measured in mm equal to at least 75 % of that obtained with the positive control codeine was considered as positive.

SBPCFC were performed with egg white, according to a scale of increasing doses: a first progression implemented a cumulated dose of 965mg. If negative, a second scale was used the second day up to a cumulated dose of 7110 mg.[20]

Methods of in vitro tests

Materials

Lysozyme from chicken egg white and lysozyme from human milk were purchased from Sigma (L 7651 and L6394). Two lots of recombinant human lysozyme were provided by VENTRIA (Sacramento, CA, USA): lot P0045 (85% purity), and lot P0057 (95% purity).

A highly purified rhuL (99% purity) was prepared in the laboratory, from the 95% purity lysozyme, by using size exclusion chromatography. The purification was performed with an Akta Explorer 10 chromatography system and a Superdex 200 HR10-30 column (GE-Healthcare) equilibrated with PBS buffer (30 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4), at a flow rate of 0.5 mL/min. The lyophilised recombinant human lysozyme (95% pure) was dissolved in PBS at a concentration of 10 mg/mL and injected on the column using a 500 µL sample loop. A massive peak which elution volume (19.5 mL) corresponds to the expected mass of recombinant human lysozyme and several minor shoulders were observed. Fractions (0.5 mL) were collected along the entire peak and each fraction was run on a SDS polyacrylamide gel to determine its purity. The corresponding gels were stained both with Coomassie Blue and silver. The purest fraction i.e. the ones with a unique band were pooled and the protein concentration was determined using a modified Bradford procedure (BioRad).

SDS-PAGE

Gel electrophoresis were carried out under reducing conditions in 12% polyacrylamide precast gels (NuPAGE® Novex Bis-Tris) using the XCell SureLock™ Mini-Cell according to the manufacturer's instructions (InVitrogen, USA), and were stained with either Coomassie Brilliant Blue or GelCode Silver SNAP Silver Stain from Pierce. Gels were loaded with 12.5 µg of different lysozymes for Coomassie staining and with 2 µg for silver staining. See Blue Plus 2 Pre-Stained Standard (InVitrogen, USA) was used as molecular weight standards. Immunoblotting with HEL, rhuL, BML was carried out on a 1/20 diluted serum with HEL sIgEs > 100 kU/L. Bound IgEs were detected by peroxidase-conjugated goat anti-human IgEs (KPL), using ECL Plus western blotting kit (Amersham Biosciences).

ELISA and ELISA inhibition

The binding of specific IgE antibodies to hen's egg lysozyme (Sigma L7651) was determined by ELISA. Microtiter plates (Nunc Maxisorp) were coated (100 µL/well) with hen's egg lysozyme at 15µg/mL in PBS pH 7.4. Plates were blocked with 0.5% gelatin from cold waterfish skin (Sigma, St-Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline (PBS) and incubated with control and patient sera. . When levels of specific IgE for hen's egg lysozyme allowed it, sera were diluted from 1: 2 to 1: 12 in incubation buffer (10% FBS and 0.001% Tween 20 in PBS pH 7.4); the others were used undiluted. For ELISA inhibition studies, these sera were pre-incubated with either hen's egg lysozyme in a concentration range from 0.1 ng/mL to 100ng/mL or recombinant human lysozyme in a concentration range from 0.1 ng/mL to 100 000 ng/mL (final concentrations). RhuL of 85% and 95% purity were used for the first and second part of study, respectively. Specifically bound sIgE were detected by peroxidase-conjugated goat anti-human IgE antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, USA) and revealed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Pierce). The enzymatic reaction was stopped by 2M H_2SO_4 and the absorbance was immediately read at 450 nm with an automated microplate reader.

The criteria of positivity of ELISA to hen's lysozyme (O.D. ≥ 0.10) have been chosen to be higher than backgrounds measured in presence of incubation buffer only (0.055 ± 0.017; 34 determinations; mean ± SEM) and of non atopic sera (0.070 ± 0.006; 9 determinations; mean ± SEM).For inhibition tests, a 30 % decrease of bound specific IgEs is considered to be significant for clear inhibition. The decrease was calculated as the mean of the percentages of decrease for each concentration, taking also in consideration the aspect of the curve, according to the preliminary assay using a scale of concentrations of egg lysozyme in the pre-incubation step.

Basophil activation tests

Heparinized fresh whole blood (100µL) is incubated with allergens at final various concentrations (100 and/or 1 µg/mL in PBS) for 20 minutes at 37°C. Six different allergens were tested: in final concentration 100µg/mL and /or 1 µg/mL, in phosphate buffer saline: hen's lysozyme (Sigma, 95%), lysozyme from human milk (Sigma), human recombinant lysozyme expressed in rice (Ventria) : 85,95,99% purity. A solution containing rice proteins obtained after boiling 10 minutes 0.4 g of white rice in 3 mL PBS during 10 min, then centrifuged. The supernatant diluted 1:100 was used for the test of cellular activation. The chemotactic peptide N-Formyl Met-Leu-Phe (fMLP) is used as a positive control, addition of washing solution serves as negative background control.

The cells are then labelled with the two-colours antibody reagent consisting with two different murine monoclonal antibodies: the monoclonal antibody anti IgE-PE reacts with human IgE and detects basophilic granulocytes. The monoclonal antibody anti CD63-FITC recognizes a glycoprotein expressed on activated basophilsCells were analyzed by flow cytometry using an EPICS XL (Coulter Beckmann, France) equipped with a 488 nm laser.Cells were analyzed by gating on basophilic granulocytes expressing high amounts of IgE (1000 cells). The results were expressed by the percentage of activated basophilic granulocytes CD63+.

According to the manufacturer recommendations, more than 15% of activated basophils should be considered as a positive test.

Results

First part: Retrospective study on 60 sera from EA patients

ELISA to HEL was performed on the 40 sera evidenced as positive for the presence

of specific IgEs to hen's egg lysozyme (HEL) by screening with Cap System EIA. For all sera, positive results were obtained according to the upper limit of the background OD, while tests were negative in the five control sera. Based on the results of inhibition tests by HEL, 9 sera exhibiting a low OD for HEL (< 0.22) were discarded. Clinical data of patients corresponding to the 30 remaining sera were collected (Table 1). One patient (n°19), was exquisitely sensitive to HEL, since a DBPCFC was positive at 240 µg.

A clear inhibition by HEL, 10 and 100 ng/mL was observed in all cases and ranged between 32% and 93% (Table 2). The inhibition by rhuL was done with the 85% purity rhuL. In addition, four sera were further controlled with 95% purity rhuL. None of the sera showed inhibition at concentrations 0.1, 10, 100, 1000 ng/mL. For concentrations at 10 000 and 100 000 ng/mL, six inhibition tests were positive, 4 of them being positive at both concentrations(n°5, 9 ,19, 29) (Figure 1 A,B,C). There was no correlation with the level of OD to HEL.

Second part: ex vivo study

Bat was performed on blood of 33 patients and 5 control subjects (Table 3). ELISA, ELISA inhibitions were carried out in 22 patients.

ELISA inhibition by HEL was observed in all cases while inhibition by rhuL was observed for just one patient. This case exhibited mean inhibitions of IgE binding on HEL of 45% for 10 000 ng/mL of 95% rhuL (3 assays), and of 27% at 10 000 ng/mL of 99% rhuL (2 assays)

Both BAT to HEL and rhuL were negative in 3/5 controls (2/5 showing a non specific basal activation). Out of 33 patients, a basal activation in 5 cases does not allow to consider the results to lysozyme (Table 4).Out of the remaining 28 BAT in egg allergic patients, 17 BAT were positive to HEL and globally 14/17 of these patients had a positive BAT to 85% rhuL with an activation level between 16% and 95%. In a more detailed way, on eight patients with a positive BAT to 85% rhuL, 7/8 maintained a positivity to 99% rhuL. The intensity of activation decreased proportionally to the degree of purity (Figure 2).

Eight out of 21 BAT to rice were positive and specifically 7 out of 8 are observed for patients with positive BAT to rhuL.

Two out of 17 BAT to BML were positive. Out of 9 patients with positive BAT to rhuL, and tested to BML, 7 were negative to BML, two were positive (cases 1 and 2).

15 sera were screened for anti-carbohydrate IgE. Out of six cases with a double positivity of BAT to rhuL and to rice, 4 had a positive Cap to bromelaine(from 0.4 to 1.56 kU/L). Out of 9 cases with a double negativity to rhuL and to rice, 3 had a positive Cap to bromelaine (from 0.14 to 0.20 kU/L) The detection of glycoproteins in rhuL was negative (data not shown).

Finally immunoblotting of a serum with a high level of anti-HEL IgE (>100 kU/L) confirmed the absence of binding to 95% purity rhuL, BML (Figure3).

Discussion

HEL, Gal d 4, represents 3.5% of egg white proteins. The precursor comprises 147 aminoacids for a molecular weight of 16.2 kDa. The mature protein, obtained after clivage of the signal peptide, is constituted of 129 aminoacids for a molecular weight of 14.3 kDa (Figure4). The prevalence of sensitization is low in Denmark and has previously been estimated to 35% of EA patients.[13,21] The systematic screening required in this study indicates an increase of this prevalence, since specific IgEs were detected in 66.7% of sera from children allergic to egg (40/60 sera), showing that HEL has now to be considered as a major allergen. This fact may be due to an increased consumption of industrial foods, containing HEL as a food additive (E 1105).[22-23] Important amounts of non degraded lysozyme gain access to

the blood, due to its resistance to heating, to acid pH, and to proteolytic enzymes, all these properties contributing to the lysozyme immunogenicity.[24] In mice, an intensive exercise provokes an increase of plasmatic concentration and a more intense sensitization.[25] The clinical relevance of HEL has been established by food challenges, inhalation tests and conjunctival tests[15-18]
HEL specific T-cell lines have been obtained from EA patients.[26] T epitopes have been described in mice, corresponding to aminoacid sequences 11-35 and 107-116. It has been shown that a decrease in the conformational stability of hen-egg lysozyme (HEL) induces an increase of the susceptibility to intracellular antigen processing and consequently enhances its capacity to activate HEL-specific Th2 cells.[27] B human specific IgEs recognize both conformational and sequential epitopes.[28] However, the major part of epitopes binding to IgE antibodies is conformational epitopes.[29]

The rhuL being equivalent to the autologous self protein should not be immunogenic. But the percentage of identity between sequences of human lysozyme and HEL in their mature forms is 60.9%. Moreover, the calculated RMSD (root mean square deviation) of 0.71 is a very low value. This indicates that the 2 structures are very similar, suggesting the possibility for common epitopes, consequently requiring absolutely searching for a latent cross reactivity (Figures 4 and 5).[11] Besides, attention has to be paid to the fact that it is resistant to heating, acidic pH and proteolytic enzymes, and that the amount which has to be considered is in the range of several tens of milligrams.[30]
IgE binding capacity can be explored by ELISA and ELISA inhibition and *ex vivo* basophil assays can demonstrate an IgE dependant activation (11,31)Out of 52 ELISA inhibition tests, a significant inhibition by rhuL can be hold for 2 concentrations in 4 cases. One case (second study) does not maintain a significant inhibition with the 99% purity rhuL. Moreover these results were obtained only with concentrations 1000 to 10 000 fold superior to HEL concentrations.
The allergen induced basophil activation relies on the bridging of two neighbouring membrane IgE, involving a high affinity of paratopes for epitopes, and multivalent B epitopes. This activation is a necessary condition for the release of mediators leading ultimately to the clinical reaction.[31] The result of a BAT is therefore closer to allergy than the detection of IgE binding by ELISA or such other techniques. However it has been shown, for other food allergens, Mal d 1, Dau c 1, and Api g 1, that there is no strict correlation between a positive BAT and allergy.[32]

The frequency of positive BAT to rhuL, (14/17 patients with a positive BAT to HEL) contrasting with the ELISA inhibition test results, leads to suspect the interference of other sensitizations. The fact that 7 out of 14 of these patients have positive BAT to rice may be interpreted in the sense of positivity linked to residual rice proteins in the purified rhuL. Indeed children allergic to egg, with a past history of atopic dermatitis in infancy, have often multiple food sensitizations and multiple food allergies [33-34]. They are frequently co-sensitized to wheat, a cereal as rice, and may have anti-wheat IgE crossreacting with rice. All children currently eat rice without any incident. The degree of activation clearly diminishes with a heightened degree of purification and may argue for this hypothesis, as well as the positive BAT to rice .
Finally two patients have a positive BAT to BML, which might mean that there is in these cases the recognition of a consensual epitope that could exceptionally induce IgE in a patient sensitized to HEL, and then recognize the same epitope in human

lysozyme. However this is a mere hypothesis, since the commercial BML was poorly purified and may contain other breast milk proteins, some of which exhibit a cross reactivity with cow's milk. Sera of these patients may contain anti-cow's milk IgE. (35)

In conclusion, these *in vitro* and *ex vivo* tests indicate a rare possibility of an *in vitro* cross reactivity in particular technical conditions using high concentrations of rhuL. The frequent unexpected positivity of BAT is likely the result of interference with a latent sensitization to rice in polysensitized patients, as documented by the lowering of the intensity of activation when increasing the degree of purification of rhuL. A complementary *in vivo* study should be considered, comparing in children sensitized to HEL, DBPCFC to HEL and to transgenic rice supplying an equivalent amount of rhuL or an amount corresponding to the previewed therapeutical amount.

References

1. Dziarski R, Gupta D. Peptidoglycan recognition in innate immunity. J Endotoxin Res 2005; 11:304-10.
2. Huang J, Wu L, Yalda D, Adkins Y, Kelleher SL, Crane M, et al. Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. Transgenic Res 2002; 11:229-39.
3. Dommett R, Zilbauer M, George JT, Bajaj-Elliott M. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. Mol Immunol 2005; 42:903-12.
4. Lodovina R, Jouja V. Influence of oral lysozyme administration on serum immunoglobulin and intestinal secretory IgA levels in infants. Acta Pediatr Scand 1977; 66:709-12.
5. Lonnerdal B. Expression of human milk proteins in plants. J Am Coll Nutr 2002; 21:S 218-21.
6. Zavaleta N, Figueroa D, Rivera J, Sanchez J, Alfaro S, Lonnerdal B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44:258-64.
7. Metcalfe D, Astwood J, Townsend R, Sampson H, Taylor SL, Fuchs RL, et al. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Crit Rev Food Sci Nutr 1996; 36:S165-86.
8. Commission CA. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant- DNA plants. Annex on the assessment of possible allergenicity. Alinorm 2003; 03/34 Joint FAO/WHO Food Standard Programme 25th session 30-06 5 07 2003 Appendix III and IV: 47-60.
9. Goodman RE, Hefle SL, Taylor Sl, van Ree R. Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: a review. Int Arch Allergy Immunol 2005; 137:153-66.
10. Moneret-Vautrin DA.Transgenic plants: what we do and don't know about the risks of allergenicity. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2006; 46:85-91.
11. Aalberse RC. Assessment of sequence homology and cross-reactivity. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 207:149-51.
12. 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.
13. Frémont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA. Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. Allergy 1997; 52:224-8.
14. Walsh BJ, Hill DJ, Macoun P, Caims D, Howden ME. Detection of four distinct groups of hen egg allergens binding IgE in the sera of children with egg allergy. Allergol Immunopathol 2005; 33:183-91.

15. Park HS, Nahm DH. New occupational allergen in a pharmaceutical industry: serratial peptidase and lysozyme chloride. Ann Allergy Asthma Immunol 1997; 78:225-9.
16. Quirce S, Diez-Gomez ML, Eiras P, Cuevas M, Baz G, Losada E. Inhalant allergy to egg yolk and egg white proteins. Clin Exp Allergy 1998; 28:478-85.
17. Leser C, Hartmann AL, Praml G, Wuthrich, B. The "egg-egg" syndrome: occupational respiratory allergy to airborne egg proteins with consecutive ingestive egg allergy in the bakery and confectionery industry. J Investig Allergol Clin Immunol 2001; 11:89-93.
18. Escudero C, Quirce S, Fernandez-Nieto M, Miguel J, Cuesta J, Sastre J. Egg white proteins as inhalant allergens associated with baker's asthma. Allergy 2003; 58:616-20.
19. Dreborg S. Diagnosis of food allergy: tests in vivo and in vitro. Pediatr Allergy Immunol 2001; 12:24-30.
20. Moneret-Vautrin DA, Rance F, Kanny G, Olsewski A, Gueant JL Dutau G et al. Food allergy to peanuts in France-evaluation of 142 observations. Clin Exp Allergy 1998; 28:1113-9.
21. Aabin B, Poulsen LK, Ebbehoj K, Norgaard A, Frokiaer H, Bindslev-Jensen C, et al. Identification of IgE-binding egg white proteins: comparison of results obtained by different methods. Int Arch Allergy Immunol 1996; 109:50-7.
22. Yoshida A, Takagaki Y, Nishimune T. Enzyme immunoassay for hen egg white lysozyme used as a food additive. J Assoc Off Anal Chem 1991; 74:502-5.
23. Yamada T, Yamada M, Sasamoto K, Nakamura H, Mishima T, Yasueda H, Shida T, Iikura Y. Specific IgE antibody titers to hen's egg white lysozyme in allergic children to egg. Arerugi 1993; 42:136-41.
24. Hashida S, Ishikawa E, Nakamichi N, Sekino H. Concentration of egg white lysozyme in the serum of healthy subjects after oral administration. Clin Exp Pharmacol 2002; 29:79-83.
25. Yano H, Kato Y, Matsuda T. Acute exercise induces gastrointestinal leakage of allergen in lysozyme- sensitized mice. Eur J Appl Physiol 2002; 87:358-64.
26. 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; 26:1080-8.
27. So T, Ito H, Hirata M, Ueda T, Imoto T. Contribution of conformational stability of hen lysozyme to induction of type 2 T-helper immune responses. Immunology 2001; 104:259-68.
28. Mine Y, Zhang JW. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. J Agric Food Chem 2002; 50:2679-83.
29. Ito HO, Nakashima T, So T, Hirata M, Inoue M. Immunodominance of conformation-dependent B-cell epitopes of protein antigens. Biochem Biophys Res Commun 2003; 308: 770-6.
30. Lonnerdal B. Recombinant human milk proteins. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2006; 58:207-15.
31. Valent P, Hauswirth AW, Natter S, Sperr Wr, Bühring HJ, Valenta R. Assays for measuring in vitro basophil activation induced by recombinant allergens. Methods 2004; 32:265-70.
32. Erdmann SM, Sachs B, Schmidt A, Merk HF, Scheiner O, Moll-Slodowy S, et al. In vitro analysis of birch-pollen associated food allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test. Int Arch Allergy Immunol 2005; 136:230-8.
33. de Boissieu D, Matarazzo P, Rocchiccioli F, Dupont C. Multiple food allergy: a possible diagnosis in breastfed infants. Acta Paediatr 1997; 86:1042-6.
34. Walker-Smith J. An eye witness perspective of the changing patterns of food allergy. Eur J Gastroenterol Hepatol 2005; 17:1313-6.
35. Schulmeister U, Swoboda I, Quirce S, de la Hoz B, Ollert M, Pauli G, Valenta R, Spitzauer S. Sensitization to human milk. Clin exp Allergy 2007; 38:60-6

Table 1. Clinical data of 30 patients allergic to egg and sensitized to HEL

		Prick tests (mm)			sIgE (kU/L)		DBPCFC to				
							Egg			HEL	
P	Age (y)	cod	REW	HEL	Egg	HEL	used	Dose (mg)	Clinical reaction	Dose	Clinical reaction
1	5	4.0	22.0	nd	6.1	1.6	EW, c	965	Ap	nd	
2	4	4.0	11.0	25.0	2.4	8.0	nd	nd	nd	nd	
3	11	3.0	20.0	6.0	25.5	<0.4	EW, r	15	A	136 mg	Ap, U
4	3	5.0	15.0	nd	3.6	0.5	EW, c	4000	E	nd	
5	3	2.0	13.0	nd	1.8	0.9	EW, c	2000	A	nd	
6	2	3.0	12.5	15.5	5.2	0.7	EY, c	7110	U, Ap, W	nd	
7	4	3.0	16.0	18.0	9.4	0.7	EW, c	965	Ap, La	nd	
8	6	6.0	7.5	12.5	90.5	2.9	nd	nd	nd	nd	
9	9	2.5	7.0	nd	14.4	0.8	EW, c	900	D, W	nd	
10	4	2.0	7.5	8.0	45.2	6.2	EY, c	65	Ap	nd	
11	9	3.0	7.0	nd	11.0	3.0	EW, r	7110	Lao	nd	
12	10	3.5	18.5	9.5	28.4	7.8	c	7110	R, Ap	nd	
13	3	2.0	6.0	22.5	3.5	15.0	nd	nd	nd	nd	
14	2	2.0	9.0	8.5	33.7	10.9	r	965	Vo	nd	
15	3	3.0	17.0	6.0	29.0	1.1	c	610	C	nd	
16	4	4.0	25.0	nd	33.3	1.8	nd	nd	nd	nd	
17	6	4.0	25.0	nd	40.5	5.6	r	965	Ap,D	nd	
18	5	4.0	16.5	22.0	35.5	7.4	nd	nd	nd	nd	
19	22	2.0	6.0	12.5	>10	nd	nd	nd	nd	240 µg	C, P, La + lingual AO
20	4	2.0	11.5	nd	27.7	4.9	EY, c	965	Ap, Pa, U	nd	
21	9	3.0	22.0	nd	17.1	3.4	c	965	Ap, A	nd	
22	4	5.0	11.0	19.0	6.9	0.46	c	7110	Ap	(-)	
23	3	6.0	12.0	nd	66.5	10.3	EY, c	7110	Ec	nd	
24	3	3.0	10.5	nd	nd	0.9	c	965	P, Ap	nd	
25	25	6.0	15.0	18.5	5.4	2.2	c	965	Ap, C, La	nd	systemic reaction to PT
26	8	2.0	30.0	20.0	42.6	17.1	nd	nd	nd	nd	
27	4	4.0	3.0	17.5	59.8	3.2	c	965	Vo, Ap, C, dBP	(-)	
28	5	2.0	9.5	nd	6.2	1.1	r	2000	U	nd	
29	7	4.0	12.5	nd	4.8	0.9	c	7110	D, Ec	nd	
30	5	2.5	17.5	12.5	87.0	14.8	nd	nd	nd	nd	

P, patients ; c, cooked; cod, codéine, positive control; DBPCFC, Double Blind Placebo-Controlled Food Challenge; EW, egg white; EY, egg yolk; Lys, hen's egg lysozyme; PT, prick test; r, raw; REW, raw egg white; sIgE, specific IgE measured by Cap System RAST ; y, years

Clinical reactions: A, asthma; AO, angioedema; Ap, abdominal pain; C, cough; D, diarrhea; dBP, decreased blood pression; E, erythema; Ec, eczema; La, labial angioedema; Lao, laryngeal angioedema; P, pruritis; Pa, palpebral angioedema; R, rhinitis; U, urticaria; Vo, vomiting; W, wheezing; (-), negative.

Table 2. ELISA et ELISA inhibition test to HEL and to rhuL

		Inh (%) by HEL 10 and 100 ng/mL		Inh (%) by rhuL 10 000 and 100 000 ng/mL	
P	ELISA to HEL (OD)	10	100	10 000	100 000
1	0.15	50	48	14	13
2	0.28	9	71	1	0
3	0.22	21	32	21	5
4	0.15	nd	36	nd	32
5	0.22	54	58	42	34
6	0.17	13	58	14	10
7	0.17	45	63	0	7
8	0.18	28	47	0	13
9	0.21	55	64	38	31
10	0.24	51	63	0	3
11	0.23	37	59	27	8
12	0.48	76	83	17	20

13	0.42	0	80	0	0
14	0.92	92	92	nd	10
15	0.36	53	42	12	7
16	0.64	63	88	11	9
17	1.10	92	92	nd	nd
18	0.85	66	90	nd	nd
19	1.36	65	86	63	37
20	0.74	82	86	21	70
21	1.22	51	93	21	15
22	1.07	44	89	8	5
23	0.96	83	91	12	3
24	0.78	34	52	9	6
25	0.65	65	59	24	17
26	1.10	85	89	2	6
27	0.75	85	88	0	0
28	0.47	58	60	0	0
29	0.31	52	60	38	38
30	0.45	61	72	0	0

P, patients ; Inh, inhibition ; HEL, hen's egg lysozyme ; rhuL, recombinant human lysozyme; OD, optical density.

Table 3. Clinical data of 38 patients allergic or sensitized to egg and sensitized to lysozyme investigated by ELISA and BAT

			Prick tests (mm)						sIgE (kU/L)		DBPCFC to egg		
P	**Age (y)**	**Clinical history**	**cod**	**REW**	**ce HEL**	**fa HEL**	**Wheat**	**Rice**	**Egg or EW**	**HEL**	**used**	**Dose (mg)**	**Clinical reaction**
1	2	AD	4.0	0.0	0.0	nd	nd	nd	nd	nd	EW	7110	(-)
2	5	AD	4.0	14.0	2.0	11.0	nd	2.0	EW>100	1.6	EW	7110	Ap
3	4	AD, U, A	8.0	nd	8.0	27.5	nd	6.0	EW: 39.1	5.9	nd		
4	8	AD, AO	3.0	15.5	4.5	19.5	0.0	0.5	EW: 19.5	8.4	nd		
5	3	AD	5.0	23.0	8.5	40.0	0.0	nd	E: 24.	nd	nd		
6	12	AD, AO	3.0	4.0	4.0	nd	7.0	nd	E: 18.6	nd	nd		
7	3	AD	3.5	7.5	0.0	3.0	0.0	3.0	EW: 21.2	nd	EY	7110	(-)
8	6	G	3.0	11.0	7.0	nd	nd	nd	E: 4.0	0.4	EW	7110	Ap, D
9	3	AD, A	2.0	8.0	8.5	nd	2.0	0.0	nd	1.0	EW	7110	(-)
10	2	AD, G	3.0	14.0	20.0	6.5	nd	0.0	EW: 21.9	2.1	EW	7110	(-)
11	4	AD	4.0	1.5	0.0	nd	nd	0.0	EW: 0.9	nd	EW	965	W
12	12	G	2.5	3.0	2.5	0.0	3.0	3.0	E: 8.2	0.4	nd		
13	2	AD	6.0	5.0	4.0	7.5	0.0	nd	EW: 4.3	0.5	nd		
14	4	AD	3.0	5.0	nd	15.0	nd	0.5	EW: 1.0	0.5	nd		
15	9	AD	4.0	10.0	3.0	7.0	0.0	0.0	EW: 20.1	0.7	EW	7110	(-)
16	5	AD, U, Lao	5.0	9.0	0.0	3.0	0.0	0.0	EW: 2.0	0.4	EW	2990	E
17	8	AD, U, Lao	3.5	12.0	0.5	1.5	3.5	7.5	E: 2.9	0.0	EW	7110	W
18	9	AD	2.0	0.0	0.5	7.5	3.5	0.5	EW: 5.8	0.0	EW	7110	(-), failure of R
19	5	AD, Lao	2.5	20.0	8.0	7.0	0.0	0.0	E: 17.5	nd	EY	7110	Ap, D
20	2	A, La	3.0	6.5	0.0	3.0	nd	nd	EW: 0.9	0.0	nd		
21	5	AD	3.0	11.0	0.0	1.5	nd	5.5	E: 0.6	0.8	EW	7110	(-)
22	7	AD	2.5	6.5	5.5	17.0	0.0	0.0	E: 1.8	0.8	EW	7110	(-)
23	8	AD	4.5	10.0	2.0	5.0	0.0	0.5	EW: 6.4	0.0	EW	4000	Ec, P
24	2	AD	3.0	3.0	0.0	0.0	0.5	nd	nd	0.0	EW	7110	(-)
25	11	AD, A	5.0	6.0	4.5	nd	nd	nd	EW: 13.0	3.2	EW	965	Ap, Vo
26	6	AD, U, Lao	3.0	11.0	4.0	nd	nd	nd	E: 38.3	0.0	EW	965	Ap
27	4	AD	3.0	10.5	2.0	nd	nd	nd	EW: 4.6	0.0	EW/EY	7110	(-)
28	4	AD, A	3.0	11.5	5.0	25.0	3.5	0.0	EW: 36.4	15.0	EW	7110	(-)
29	6	AD, A	3.0	11.0	16.5	nd	6.0	0.0	EW: 6.0	0.5	EY	7110	(-), failure of R
30	4	AD	2.0	6.0	2.0	nd	1.5	nd	E: 20.4	0.0	EW	965	Ap, D
31	2	AD	2.0	9.0	0.0	nd	3.5	nd	EW: 34.2	0.0	nd		
32	7	AD	3.5	13.0	2.0	nd	0.0	nd	E: 5.3	0.0	EW	7110	P
33	2	AD	1.5	9.5	2.0	10.0	nd	nd	EW: 33.8	5.2	EW	7110	(-)
34*	7	AD	3.5	9.0	0.0	nd	0.0	nd	EW: 0.6	0.0	EW	7110	(-)
35*	8	AD, A	4.0	8.5	0.5	nd	nd	0.0	E: 9.8	0.0	EW	7110	(-)
36*	4	AD	4.0	18.0	0.0	nd	nd	nd	EW: 1.8	0.0	EY	7110	(-)
37*	5	AD, A	1.5	10.0	0.0	nd	1.5	nd	EW: 10.7	0.0	EY	7110	(-)
38*	4	AD, U, Lao	3.5	14.0	1.5	nd	0.0	nd	E: 5.0	0.0	EW	7110	Ec, P

P, patients; *, controls; cod, codéine, positive control; DBPCFC, Double Blind Placebo-Controlled Food Challenge; EW, egg white; EY, egg yolk; Lys, hen's egg lysozyme; ce HEL, commercial extract of hen's egg lysozyme; fa HEL, food additive; REW, raw egg white; sgE, specific IgE measured by Cap System RAST, R, reintroduction.

Clinical reactions: A, asthma; AO, angioedema; AD, atopic dermatitis; Ap, abdominal pain; D, diarrhea; E, erythema; Ec, eczema; G, gastrointestinal symptoms; Lao, laryngeal angioedema; La, labial angioedema; P, pruritis; U, urticaria; Vo, vomiting; W, wheezing; (-), negative; (+), positive.

Table 4. Results of the BAT (CD63+ %) in egg allergics patients (n=33) and in controls (n=5) after incubation with rhu Lysozyme 85% purity (100µg/ml), rhu Lysozyme 95% purity (100µg/ml), rhu Lysozyme 99% purity (100µg/ml), breast milk lysozyme and rice extract.

P	HEL	rhu L 85%	rhuL 95%	rhuL 99%	BML	rice extract
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-
5	+	+	-	+	-	-
6	+	-	-	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+
8	-	+	+	+	-	-
9	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	//	//	//	//	//	//
13	//	//	//	//	//	//
14	//	//	//	//	//	//
15	+	+	+	nd	nd	+
16	+	+	+	nd	nd	+
17	-	-	-	nd	nd	+
18	-	-	-	nd	nd	-
19	+	nd	-	nd	-	-
20	+	nd	-	nd	-	-
21	-	nd	+	nd	-	+
22	-	nd	-	nd	-	-
23	-	nd	-	nd	-	-
24	-	nd	-	nd	-	-
25	+	+	nd	nd	nd	nd
26	+	+	nd	nd	nd	nd
27	+	+	nd	nd	nd	nd
28	+	+	nd	nd	nd	nd
29	+	+	nd	nd	nd	nd
30	+	+	nd	nd	nd	nd
31	+	+	nd	nd	nd	nd
32	-	-	nd	nd	nd	nd
33	//	//	nd	nd	nd	nd
34*	+	+	nd	nd	nd	nd
35*	+	-	nd	nd	nd	nd
36*	-	-	nd	nd	nd	nd
37*	-	-	nd	nd	nd	nd
38*	//	//	nd	nd	nd	nd

P, patients; *, controls; (+); positive test; (-); negative test; (//); basal activation; nd, not determined

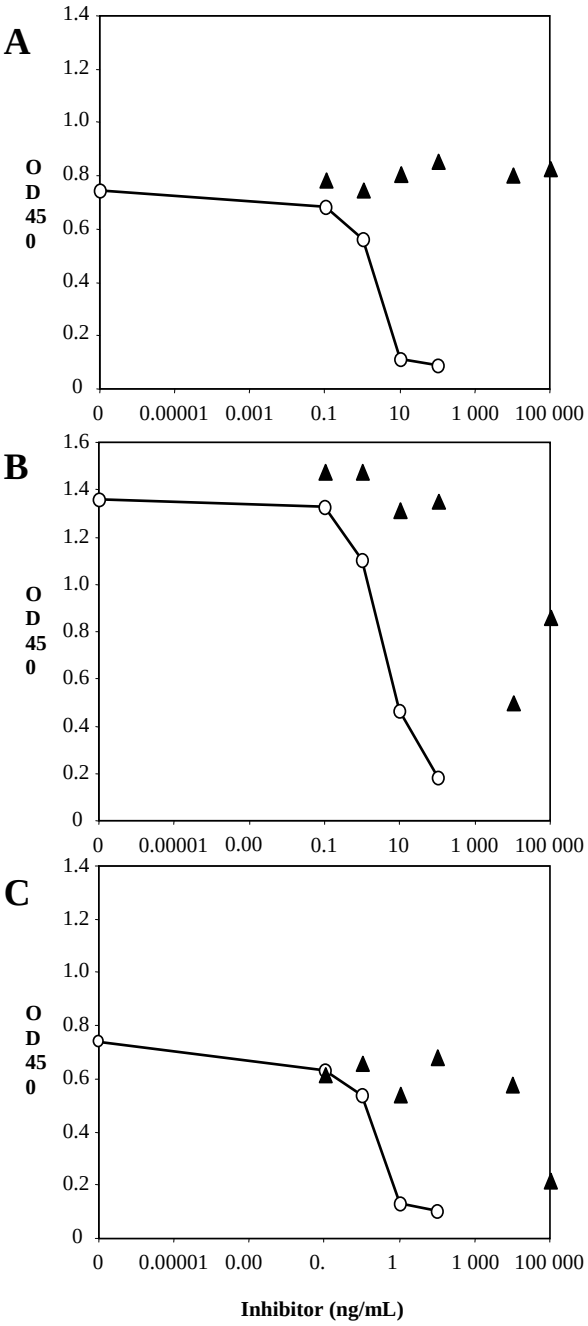


Figure 1: ELISA Inhibition with pre-incubation with HEL (○) or with rhuL (▲). (A): No inhibition; (B&C) : inhibition with rhuL for concentrations at 10 000and 100 000 ng/ml

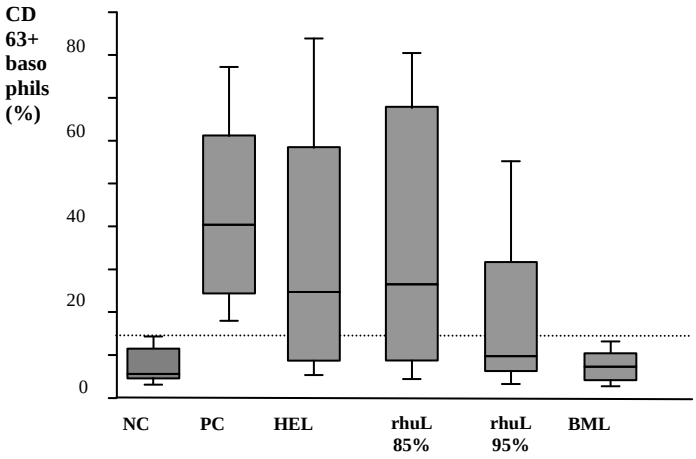


Figure 2: BAT : Mean basophil activation after incubating with HEL, rhuL 85% and 95% purity, BML .

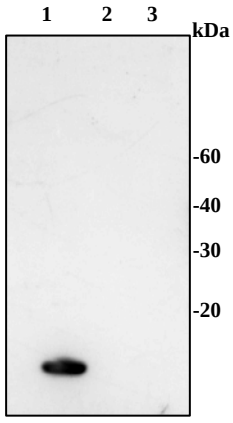


Figure 3: Immunoblot with a serum with a high level of anti IgE. (1):;(2):; (3):

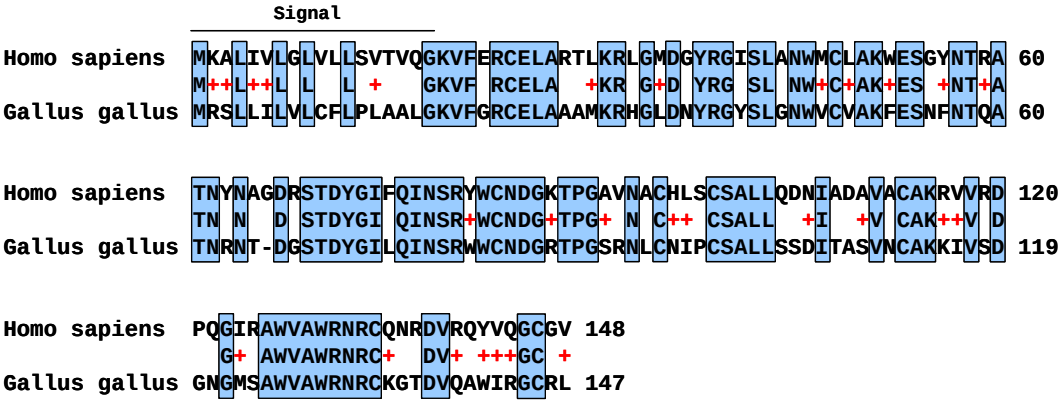
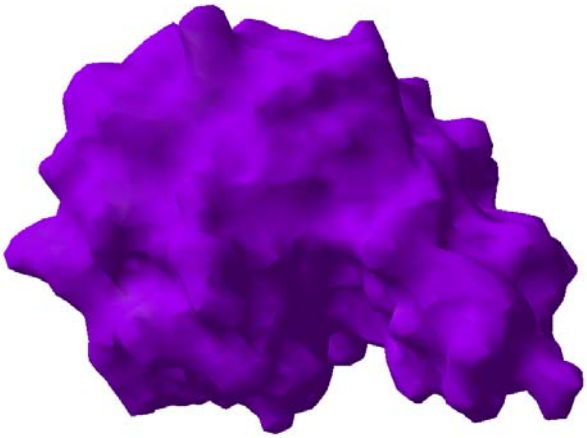
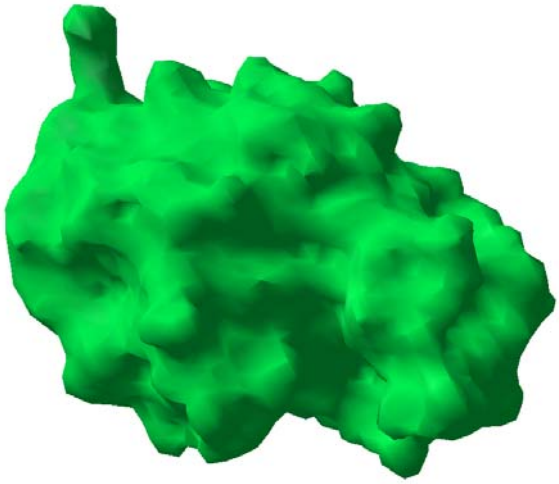


Figure 4 :

Lysozyme Homo sapiens



Lysozyme Gallus gallus



Lysozyme Homo sapiens 1REX
Lysozyme Gallus gallus 2VB1
RMS carbones alpha 0.71A (127 atomes)

Figure 5 :

ANNEXE 2

AUTRES TRAVAUX DE L'AUTEUR DANS LE DOMAINE DE L'ALLERGIE

Communications orales

Modification de l'allergenicite des proteines vegetales en fonction du procede industriel utilise. Exemple du soja. *CICBAA Symposium – Nancy 2003*

Cytokines intracellulaires (IFN-g, IL-4, IL-13, IL-10) dans les allergies au lait, œuf et arachide. *CICBAA Symposium – Nancy 2005*

Nouveaux marqueurs d'activation cellulaire. Utilisation pour le diagnostic et pour le suivi évolutif d'une allergie alimentaire. *1° Congrès français d'allergologie. Paris 2006*

Confrontations clinico-biologiques en allergologie. *Adalor - Nancy 2006.*

Posters

Poster présenté à AAAAI annual meeting 2003 :

FOOD TECHNOLOGIES MODIFY THE ALLERGENICITY OF SOYBEAN-BASED PRODUCTS

Franck P*,G. Kanny, L.Parisot**, R. Verdun*, JL.Olivier*, Moneret-Vautrin DA****

***Laboratoire de biochimie – CHU Nancy, France**

**** Service de médecine interne- Immunologie clinique et allergologie , Nancy, France**

INTRODUCTION

The allergenicity of food proteins has been shown to be modified by food-processing technologies such as heating or fermentation. The aim of our study is to compare the allergenicity of soybean proteins in different products, using the sera of 9 allergic or highly sensitized patients..

METHODS

Patients sera : The clinical characteristics of the nine patients are reported in table above.

					Prick tests (mm)					RAST		
N°	Sex	Age (years)	Symptoms	Foods	Codein	Soy flour	Sojasun milk	Texturized soy protein	Modilac milk	Cap System (KU/L)	Labial challenge (grade)	BPCFC (DB or SB) mg to soy flour
1	M	12	anaphylactic shock	texturized soy protein	2.5	4	10	9	4.5	34.5	0	-965
2	F	16	acute asthma	texturized soy protein	2	2.5	4	4	3	12	nd	-7000
3	M	7	asthma, atopic dermatitis		2	15.5	10.5	2	1.5	11	0	+265 - asthma
4	M	45	anaphylactic shock	chinese meal	3.5	-	-	-	-	1.2		-965
5	F	16	anaphylactic shock	soy proteins isolate	3.5	2	nd	1	nd	3.4	-	+9000 - rhinitis, conjonctivitis activity
6	M	10	facial AO and asthma	soy milk	2	9	9	7	10.5	>100	nd	nd
7	M	8	vomiting and cough	peanut	2	3	13	10.5	12	13.8	nd	nd
8	M	3	vomiting, AO	peanut, green peas, lentils	2	2	3	2.5	5	nd	nd	nd
9	M	5	urticaria	green peas, lentils	3	4.5	4	2	3	4.2		

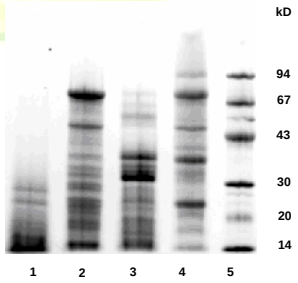
Soybean-based products : 1.infant formula milk (Modilac soja ®, 2.soy milk (Sojasun®), 3.texturized soy protein (Sojatop ®)
4. soy flour (Euronat ®),
Preparation of soybean extracts : extraction by using buffer pH 8 (0.1M tris, 0.14 NaCl, 2mM EDTA)
SDS-PAGE and immunoblotting : Phastsystem (Pharmacia)-Electrotransfer to a cellulose membrane – Detection of IgE fixation by chemiluminescence. Immunoblot inhibition : by incubating sera with protein extract from soybean flour.

SDS-PAGE RESULTS

Difference in the proportions of the various proteins fractions: Higher concentration in 37kd protein in flour and 33kD protein in soymilk

High proportions of 31-to 34- and 38-kD in texturized extract

1. Infant formula, 2.soy milk, 3.texturized soy proteins, 4. soybean flour, 5. molecular mass standard.



IMMUNOBLOT RESULTS (Molecular weight(kD) of the proteins detected by specific IgE)

Lack of allergenicity of infant formula

Texturized soy : two main allergens : 38- and 50-kD, without any allergenicity of the 30- to 34kD band

Flour and soy milk : 24, 33, 37, 49, 71-73 kD

	Soybean seeds	Sojasun ®	Texturized soy
case 1	**33 -37** - 49	24-**33-37-49**	38
case 2	**37-49-71**	**29-37**- (49)	**38-50**
case 3	31- (40)	**33**-37-41	(38) - (50)
case 4	-	-	**38** - 50
case 5	**49 -71**	49-**59**-73	-
case 6	**49 - 71**	24 -**49** -59 -**73**	**50**
case 7	24- **33-37-** (49)	(24) - **33 - 37**	(18)-(27)- **38**
case 8	33 - **49**	29 - **49**	-
case 9	**49** - 55 - 73	**49 - 59**	**50**

bold *: very strong response ;* ***bold*** *: strong response ; (x) : weak response ; - no response,*

CONCLUSIONS

All technologies applied to soybean-based products induce variation in the protein profile and allergenicity

- **Variation of the proportions of the protein fractions and of the electrophoertic profile resulting of protein denaturation, limited proteolysis and glycation protein.**
- **Lack of the major allergen Gly m Bd 30 in texturized proteins**
- **Presence of a 38-kD allergenic protein (glycinin fragment?)**
- **Lack of allergenicity of infant formula**

Poster présenté à AAAAI annual meeting 2003

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1 (Pharmacie)
Mention : Biologie cellulaire et Nutrition

Sujet : **Influence des procédés industriels sur l'allergénicité des aliments**
Nom et prénom : **Franck Patricia**

La prévalence de l'allergie alimentaire est en constante augmentation. Parallèlement les consommations alimentaires et les aliments eux même évoluent. L'aliment, de plus en plus soumis aux traitements industriels, peut présenter une allergénicité modifiée. L'objet de cette thèse sera d'évaluer l'influence des différents procédés industriels sur l'immunoréactivité des protéines alimentaires modifiées. Les différentes études présentées dans l'ouvrage aborderont l'effet de la texturation sur les protéines de soja ou de l'extrusion sur les protéines de lin (traitement thermique), l'effet de l'incorporation de nouveaux ingrédients dans l'alimentation moderne (inuline, lin). L'allergénicité des protéines recombinantes (process biotechnologique) sera abordée au travers de deux études : l'une proposera les protéines recombinantes de l'arachide comme outil diagnostique, en particulier pour le test d'activation des basophiles ; L'autre cherchera à démontrer l'innocuité allergénique d'un lysozymes recombinant humain, qui sera utilisé en alimentation humaine.
L'étude de ces propriétés allergéniques sera réalisée par les tests in vitro (prick tests et test de provocation orale) et par les tests in vitro (IgEs). Des études par immuno-empreinte (immunoblot et dot blot) et par spectrométrie infrarouge permettront d'identifier les protéines modifiées. Enfin des tests cellulaires (test d'activation des basophiles) seront également réalisés.
Mots clés : Allergie alimentaire. Allergène. Allergènes recombinants. Procédé industriel. TAB (test d'activation des basophiles). Immunoblot

Effect of industrial process on food allergy.
The prevalence of the food allergy is in constant increase. At the same time food consumptions and food they even evolve. The food, more and more subjected to the industrial treatments, can present a modified allergenicity. The aim of this thesis will be to estimate the influence of the various industrial processes on the immunoreactivity of modified food proteins. The various studies presented in the work will approach the effect of the texturisation on proteins of soy or the extrusion on flaxseed proteins (heat treatment), the effect of the incorporation of new ingredients in the modern food (inuline, flaxseed).
The allergenicity of recombinant proteins (biotechnological process) will be approached through two studies: the one will propose peanut recombinant proteins as a diagnostic tool, in particular for the basophil activation test (BAT); other one will try to demonstrate the allergenic harmlessness of a recombinant human lysozyme, which will be used in human food.
The study of these allergenic properties will be realized by the in vivo tests (prick tests) and by the in vitro tests (IgEs). Studies by immunoblot and by infrared spectrometry will allow identifying modified proteins. Finally cellular tests (BAT) will be also performed.
Key words: Food allergy; Allergen; recombinant allergen; industrial process; immunoblot; basophil activation test;