



Numéro d'ordre : 783

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

ECOLE DOCTORALE

« Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries »

THESE

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'INSA DE TOULOUSE

*Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse Industrielles*

Soutenue par Lucie MONDOULET

Le 12 juillet 2005

Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide.  
Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique  
lors des traitements thermiques et des processus digestifs

JURY

Didier COMBES : *Professeur INSA, Toulouse*  
Didier MARION : *Directeur de Recherche INRA, Nantes*  
Gabriel PELTRE : *Chargé de Recherche CNRS, Paris*  
René Marc WILLEMOT : *Professeur INSA, Toulouse*  
Elke ANKLAM : *Professeur Commission Européenne, Geel*  
Hervé BERNARD : *Ingénieur de Recherche INRA, Paris*

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examineur  
Examineur

*A Mon G-Rfum,*

*A Mes Parents,*

*A Mes Soeurs, Caroline et Elsa*

*A Mes Petits Monstres Adorés, Fanny et Armand*

# REMERCIEMENTS

*Ce travail de thèse a été réalisé à l'Unité d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) associée au Laboratoire d'Etudes et de Recherches Immunologiques (LERI) au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI) du Centre d'Etudes de Saclay (CEA).*

*Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Dr. JM Wal, Directeur de l'UIAA, pour son accueil au sein de son équipe, pour avoir accompagné ces travaux avec intérêt et pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard. Je tiens tout particulièrement à le remercier d'avoir aiguïser ma curiosité scientifique à travers les nombreux congrès et le programme européen Allergest auxquels j'ai pu participer.*

*Je tiens également à remercier Monsieur le Dr. J. Grassi, Chef de Service du SPI, pour son accueil chaleureux au sein de son Service, et pour avoir permis la réalisation de cette thèse.*

*Mes remerciements vont à Monsieur le Dr. C. Créminon, Chef de laboratoire du LERI, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et les corrections apportées à ce manuscrit.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Dr. H. Bernard pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, ses conseils pertinents et les discussions scientifiques très intéressantes que nous avons eu au cours de ce travail. Merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.*

*Je remercie par ailleurs les différents membres du jury, notamment Monsieur le Pr. D. Combes, qui me fait l'honneur de présider ce jury. Merci à Messieurs les Dr. D. Marion et G. Peltre, rapporteurs de cette thèse. Je leur suis reconnaissante d'avoir accepté ce rôle, et de me faire l'honneur de juger mon travail. Merci également à Madame le Dr. E. Anklam et à Monsieur le Pr. RM. Willemot pour leur participation dans l'évaluation de mes travaux.*

*Mes remerciements vont tout particulièrement à Madame le Dr. Ginestet, pour toutes ses connaissances qu'elle a su partager avec joie. J'adresse toute ma reconnaissance à Madame MF. Drumare, pour son aide scientifique, les longues discussions et ses conseils amicaux.*

*Je remercie Mademoiselle S. Ah-Leung et Madame L. Potelune pour leur soutien par la bonne humeur et leur aide scientifique.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le Docteur G. Clément, pour m'avoir enseigné la protéomique, Messieurs les Dr. S. Hazebrouck et JM. Chatel pour leur sympathie et Monsieur S. Nano, pour toute la partie administrative et la partie logistique indispensables à la réussite de cette thèse.*

*Je remercie Monsieur le Docteur Thai pour avoir réalisé avec grand soin tous les séquençages des protéines purifiées. Un petit coup de pouce pour une grande réussite.*

*Je n'oublie pas les bons moments partagés avec Monsieur le Docteur H. Volland et Monsieur H. Boutal, ainsi qu'avec les « Prionettes », Mesdemoiselles C. Feraudet, N. Morel et S. Simon et les « Monoclonaux », Madame P. Lamourette, Mademoiselle K. Moreau, Monsieur M. Plaisance et Madame le Dr. Y. Frobert, Madame MC Nevers, les « Biologistes Moléculaires », Monsieur le Docteur D. Boquet, l'équipe de Paris VII, Monsieur le Professeur JY Couraud, Madame le Docteur A. Wyjkhuisen, l'équipe de SPI-BIO, Mademoiselle K. Mouchain, Madame le Dr. M. Sagot, Monsieur le Docteur C. Tiberghien, ainsi que tous les nouveaux arrivants que je ne citerai pas mais qui se reconnaîtront.*

*Je tiens également à remercier pour leur gentillesse tous les différents membres du Laboratoire d'Etude du Métabolisme et du Médicament.*

*Merci à tous les thésards du SPI pour leur sympathie durant ces trois années de thèse.*

*Cette thèse a été co-financée par le programme européen Allergest. Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors des différentes réunions de travail pour m'avoir toujours accueillie chaleureusement. Merci de m'avoir fait connaître votre travail.*

*J'adresse mes derniers mots à mes parents, sans qui je n'aurais jamais réalisé tout ce parcours. J'espère que vous serez fiers de votre cadette. Merci à mes sœurs, tout simplement pour avoir été toujours été là. Notre complicité a été un soutien indispensable. A mon G-Rhum qui est et sera par un grand « OUI » le plus beau souvenir de ma thèse.*

## ABREVIATIONS

ACh	<b>AcétylCholine</b>
AChE	<b>AcétylCholinestérase</b>
blg	<b>B-lactoglobuline</b>
Con A	<b>Concanavaline A</b>
CPA	<b>Cellule Présentatrice d'Antigène</b>
DTNB	<b>5,5'-DithioNitroBenzoate</b>
DO	<b>Densité Optique</b>
EAST	<b>Enzyme Allergo Sorbent Test</b>
ECL	<b>Enhanced Chemiluminescence</b>
ELISA	<b>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</b>
Ig	<b>Immunoglobuline</b>
IL	<b>Interleukine</b>
KLH	<b>Keyhole Limpet Homocyanine</b>
LTP	<b>Lipid Transfer Protease</b>
MALDI TOF	<b>Matrix Assisted Laser Deionisation Time Of Flight</b>
MM	<b>Masse Moléculaire</b>
NSP	<b>Sérums de clinique Non SPécifique</b>
PAGE	<b>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</b>
PC	<b>Phosphatidylcholine</b>
pHi	<b>pH isoélectrique</b>
RAST	<b>Radio Allergo Sorbent Test</b>
SAB	<b>Sérum Albumine Bovine</b>
SDS	<b>Sodium Dodecyl Sulfate</b>
TBS	<b>Tris Buffered-Saline</b>
TBST	<b>Tris Buffered-Saline Tween</b>
TFA	<b>TriFluoric Acid</b>
T <sub>H</sub>	<b>Lymphocyte T Helper (auxiliaire)</b>
TNF	<b>Tumor Necrosis Factor</b>
UE	<b>Unité Ellman</b>

# Introduction

<b>I. L'allergie .....</b>	<b>2</b>
1. Les définitions : « Petites histoires et grandes dates » .....	2
2. La classification de Gell et Coombs .....	3
3. Mécanismes de l'allergie .....	4
a) <i>Les IgE et les récepteurs aux IgE</i> .....	4
b) <i>La phase de sensibilisation et la production d'IgE</i> .....	6
c) <i>La phase de déclenchement</i> .....	6
<b>II. La place de l'allergie alimentaire .....</b>	<b>8</b>
1. Importance de l'allergie alimentaire .....	8
2. Une symptomatologie variée .....	10
a) <i>Symptômes gastro-intestinaux</i> .....	10
b) <i>Symptômes cutanés</i> .....	10
c) <i>Symptômes respiratoires</i> .....	11
d) <i>Anaphylaxies généralisées</i> .....	11
3. Importance de l'allergie à l'arachide .....	12
a) <i>Par sa symptomatologie sévère</i> .....	13
b) <i>Par une forte fréquence et une faible rémission</i> .....	14
c) <i>Par des doses réactogènes faibles</i> .....	15
4. La place de l'allergie au lait de vache .....	16
a) <i>Sa fréquence</i> .....	16
b) <i>Sa symptomatologie</i> .....	17
<b>III. Les tests de diagnostic de l'allergie alimentaire .....</b>	<b>18</b>
1. Les tests <i>in vivo</i> .....	18
a) <i>Les tests cutanés</i> .....	19
b) <i>Les tests de provocation</i> .....	20
2. Les tests <i>in vitro</i> : le dosage des IgE spécifiques .....	22
<b>IV. Caractéristiques des allergènes alimentaires .....</b>	<b>24</b>
1. Caractéristiques générales .....	24
a) <i>Définitions et nomenclature</i> .....	24
b) <i>Structure</i> .....	25
c) <i>Réactions croisées</i> .....	26
2. Les familles des protéines végétales et la place des allergènes de l'arachide .....	27
a) <i>Classification</i> .....	27
b) <i>La famille des globulines</i> .....	28
(i) <i>Structure générale</i> .....	28
(ii) <i>Structure tridimensionnelle</i> .....	29
(iii) <i>Les modifications post-traductionnelles : les glycosylations</i> .....	30
(iv) <i>L'allergénicité des globulines</i> .....	32
c) <i>La famille des albumines 2S</i> .....	32
(i) <i>Structure générale</i> .....	32
(ii) <i>Synthèse et maturation des albumines 2S</i> .....	32
(iii) <i>Polymorphisme des albumines 2S</i> .....	34
(iv) <i>Composition et séquence en acides aminés</i> .....	34
(v) <i>Structure tridimensionnelle</i> .....	36

(vi) L'allergénicité des albumines 2S .....	36
d) Les allergènes de l'arachide .....	37
3. Les allergènes du lait de vache .....	39
<b>V. Conclusion et objectifs de la thèse .....</b>	<b>41</b>

## **Chapitre 1 : Purification et caractérisation des allergènes de l'arachide**

### **A. Purification des allergènes de l'arachide ..... 43**

#### **I. Extraction des protéines et purification des allergènes de l'arachide : le contexte ..... 43**

#### **II. Matériels et méthodes..... 46**

1. Préparation du tourteau d'arachide .....	46
2. Mise au point des conditions d'extraction.....	46
3. Purification des protéines de l'arachide .....	47
a) Protocole général.....	47
b) Fractionnement des protéines par précipitation au sulfate d'ammonium .....	48
c) Chromatographies .....	48
4. Caractérisation des fractions isolées et des protéines purifiées.....	49
a) Dosage des protéines .....	49
b) Séquençage des acides aminés amino-terminaux .....	50
c) Détermination des masses moléculaires par spectrométrie de masse .....	50
d) Electrophorèses en gel de polyacrylamide .....	51
e) Analyse protéomique.....	52

#### **III. Résultats et discussion..... 54**

1. Conditions d'extraction .....	54
2. Cartographie des protéines de l'arachide .....	56
3. Fractionnement, purification et caractérisation des allergènes de l'arachide.....	63
a) Fractionnement au sulfate d'ammonium .....	63
b) Etude des protéines du surnageant 40%.....	64
c) Etude des protéines du culot 40%.....	68
d) Caractérisation biochimique d'une sélection de protéines.....	70
4. Bilan de la purification .....	71

#### **IV. Conclusion ..... 72**

### **B. Répertoire des allergènes responsables de la réponse IgE chez des patients allergiques à l'arachide ..... 75**

#### **I. Introduction ..... 75**

#### **II. Matériels et méthodes..... 76**

1. sérothèque.....	76
2. Tests immuno-enzymatiques (EAST) avec immobilisation de l'allergène.....	78
a) Principe.....	78
b) Préparation des traceurs utilisés lors des différents tests immuno-enzymatiques.....	79
c) Mode opératoire.....	81
3. Test immuno-enzymatique avec capture des IgE.....	82
a) Principe de ce dosage.....	82
b) Préparation des traceurs antigène-AChE.....	83
c) Mode opératoire.....	84
4. Tests cutanés .....	86

### **III.Résultats et discussion : vers la corrélation entre le profil de la réponse IgE spécifique et la symptomatologie clinique ..... 87**

1. Profil de la réponse IgE spécifique aux allergènes des différentes familles de protéines végétales.....	87
2. Etude de la réponse IgG .....	93
3. Analyse de la réponse IgE à l'aide de la détection par capture des IgE.....	98
a) Fonctionnalité du dosage par capture.....	98
b) Validation du format de dosage.....	100
c) Application du dosage par capture des IgE à l'étude du profil de réponse IgE spécifique.....	102
d) Conclusion .....	105
4. Tests <i>in vivo</i> : les tests cutanés .....	106

### **IV.Bilan ..... 109**

## **Chapitre 2 : Identification d'épitopes des allergènes de la famille des albumines 2S et des globulines 11S**

### **A. Etude des épitopes de la famille des globulines 11S de l'arachide : l'allergène Ara h 3..... 111**

#### **I. Introduction : la protéolyse naturelle des globulines 11S ..... 111**

#### **II. Matériel et méthodes ..... 112**

1. Sérothèque.....	112
2. Purification et caractérisation des fragments de globulines 11S.....	112
3. Etude de l'immunoréactivité des globulines 11S.....	113

#### **III. Résultats et discussion..... 114**

1. Purification et caractérisation des fragments de globulines 11S.....	114
2. Immunoréactivité des fragments de globulines 11S .....	117

#### **IV. Conclusion ..... 121**

<b>B. Etude des épitopes de la famille des albumines 2S.....</b>	<b>123</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>123</b>
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>124</b>
1. Réduction et carboxyméthylation des albumines 2S.....	124
2. Hydrolyse enzymatique par la trypsine .....	124
a) Tampons .....	124
b) Digestion .....	124
c) Suivi chromatographique de la digestion enzymatique et purification des hydrolysats ....	125
3. Electrophorèses en conditions dénaturantes.....	125
<b>III. Résultats et discussion.....</b>	<b>126</b>
1. Polymorphismes des albumines 2S .....	126
a) Caractérisation biochimique.....	126
b) Immunoréactivité des isoformes.....	129
2. Effet de la réduction sur l'immunoréactivité des albumines 2S.....	131
a) Etude de l'inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE.....	131
b) Etude de l'inhibition de la liaison IgE-Ara h 6-AChE.....	132
3. Etude de la résistance à l'hydrolyse trypsique de l'allergène Ara h 2 et étude de ses épitopes .....	133
a) Hydrolyse de l'allergène.....	133
b) Immunoréactivité de l'allergène Ara h 2 au cours de l'hydrolyse et détermination des régions épitopiques .....	141
(i) Evaluation de l'immunoréactivité par ELISA direct.....	141
(ii) Etude de l'immunoréactivité par dosage par compétition avec capture des IgE .....	142
c) Conclusion .....	145
<b>C. Conclusion générale.....</b>	<b>147</b>

# Chapitre 3 : Etude de la résistance des allergènes lors des procédés thermiques et lors de la digestion ; 2 modèles : l'arachide et le lait

## A. Effet des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide ..150

### I. Introduction ..... 150

1. Procédés thermiques et structure des protéines..... 150
2. Procédés thermiques et immunoréactivité des protéines..... 151
  - a) Généralités..... 151
  - b) Le cas de l'arachide..... 152
3. Conclusion..... 153

### II. Matériels et méthodes..... 154

1. Sérums ..... 154
2. Préparation des extraits protéiques de l'arachide pour l'étude de l'effet des procédés technologiques sur l'immunoréactivité..... 154
3. Analyse de la composition et étude de l'immunoréactivité des extraits d'arachides après les différents procédés thermiques ..... 155

### III. Résultats ..... 156

1. Effet des procédés thermiques sur la composition protéique de l'arachide ..... 156
  - a) Profils électrophorétiques et immuno-empreintes des fractions protéiques extraites d'arachides crues, grillées, bouillies et de l'eau de cuisson..... 156
  - b) Profils électrophorétiques et immuno-empreintes obtenus avec les extraits d'arachides crues, grillées, bouillies et avec l'eau de cuisson ..... 157
2. Détermination de la réponse IgE spécifique contre les extraits d'arachides crues, grillées et bouillies par des tests immuno-enzymatiques ..... 158
  - a) Analyse de la réponse IgE aux extraits d'arachide brute par test direct..... 158
  - b) Analyse de la réponse IgE des extraits d'arachides crues, grillées, bouillies et de l'eau de cuisson par test indirect ..... 160
  - c) Analyse de l'immunoréactivité des allergènes Ara h 1 et Ara h 2 purifiés à partir des différents extraits..... 162

### IV. Discussion ..... 163

## B. Effet de la digestion gastro-intestinale sur l'immunoréactivité des aliments ..... 168

### I. Introduction ..... 168

1. L'exposition des allergènes à travers le tractus gastro-intestinal ..... 168
2. La structure des protéines et leur résistance à la protéolyse ..... 169

3. La stabilité des protéines lors de la digestion : une caractéristique des allergènes alimentaires ? .....	170
4. Les études de la résistance des allergènes de l'arachide et du lait de vache au cours de la digestion gastro-intestinale .....	172
5. Conclusion.....	173
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>175</b>
1. Sérums .....	175
2. Modèle de digestion gastrique et de digestion duodénale ( <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ).....	175
a) <i>Modèle de digestion in vitro</i> .....	176
b) <i>Digestion gastrique in vivo</i> .....	177
3. Analyses électrophorétiques.....	179
4. Evaluation de la quantité des protéines dans le lait : la blg et les caséines.....	179
a) <i>Dosage de la <math>\beta</math>-lactoglobuline (blg)</i> .....	179
b) <i>Dosage des caséines entières</i> .....	180
5. Etude de l'immunoréactivité des digesta d'arachide et de lait.....	181
<b>III. Résultats et discussion.....</b>	<b>182</b>
1. L'arachide.....	182
a) <i>Modèle in vitro de digestion gastrique et duodénale</i> .....	182
b) <i>Modèle in vivo : la digestion gastrique de l'arachide</i> .....	189
c) <i>Conclusion</i> .....	195
2. Le lait.....	198
a) <i>Modèle in vitro de digestion gastrique et duodénale</i> .....	198
b) <i>Modèle in vivo : la digestion gastrique du lait</i> .....	205
c) <i>Conclusion</i> .....	209
<b>IV. Conclusion générale .....</b>	<b>211</b>

<b>Perspectives</b>	<b>214</b>
---------------------	------------

<b>Annexes</b>	<b>217</b>
----------------	------------

Annexe I : spectres de masse MALDI TOF .....	217
Annexe II : corrélation de Spearman.....	225
Annexe III : représentation graphique de la réponse des sous-classes IgG par allergène.....	226
Annexe IV : purifications sur colonne C2/C18.....	227
Annexe V : sérums du programme européen Allergest.....	230

<b>Références bibliographiques</b>	<b>234</b>
------------------------------------	------------

<b>Articles</b>	<b>249</b>
-----------------	------------

# TABLE DES FIGURES

## INTRODUCTION

<b>Figure 1</b> : Structure de l'IgE humaine.....	5
<b>Figure 2</b> : Induction et mécanismes effecteurs de l'hypersensibilité de type I.....	6
<b>Figure 3</b> : Médiateurs libérés par les mastocytes et basophiles au cours de l'hypersensibilité immédiate.....	7
<b>Figure 4</b> : Structure tridimensionnelle du trimère de la proglycinine du soja.....	29
<b>Figure 5</b> : Structure tridimensionnelle de la phaseoline.....	30
<b>Figure 6</b> : Structure tridimensionnelle d'Ara h 1 établie par homologie avec la phaseoline.....	30
<b>Figure 7</b> : Structure tridimensionnelle de l'homotrimère d'Ara h 1.....	31
<b>Figure 8</b> : Structures schématisques des différentes albumines 2S.....	33
<b>Figure 9</b> : Alignement des séquences d'albumines 2 S.....	35
<b>Figure 10</b> : Structure tridimensionnelle de la napine (BnIb), albumine 2S du colza.....	36

## CHAPITRE 1

<b>Figure 11</b> : Schéma du protocole général de purification des protéines de l'arachide.....	47
<b>Figure 12</b> : Electrophorèse des extraits protéiques obtenus avec les 7 tampons.....	55
<b>Figure 13</b> : Electrophorèse bidimensionnelle d'un extrait d'arachide brute grillée.....	56
<b>Figure 14</b> : Profil peptidique en spectrométrie de masse du digesta trypsinique du spot 6.....	57
<b>Figure 15</b> : Page de résultats données par le logiciel Profound lors de la confrontation de la carte peptidique obtenue après digestion trypsinique et analyse au spectromètre de masse MALDI TOF pour le spot 6 de l'électrophorèse bidimensionnelle de l'arachide grillée.....	58
<b>Figure 16</b> : Alignement des séquences protéiques d'Ara h 6 et de la conglutine clone PSC33.....	59
<b>Figure 17</b> : Alignement des séquences protéiques de l'allergène Ara h 3 et de la glycinine Gly1.....	62
<b>Figure 18</b> : Electrophorèse SDS PAGE 12% des fractions culot et surnageant issues de la précipitation au sulfate d'ammonium 40% et des fractions issues de la chromatographie d'affinité Con A sepharose.....	64
<b>Figure 19</b> : Chromatogramme de la purification sur colonne d'échange d'anion Q Sepharose.....	65
<b>Figure 20</b> : Profil électrophorétique des fractions issues de la chromatographie d'échange d'anion pour le surnageant 40%.....	65
<b>Figure 21</b> : Chromatographie en phase inverse du pool E.....	66
<b>Figure 22</b> : Profil électrophorétique en conditions réductrices des entités protéiques finales purifiées sur colonne phase inverse.....	68
<b>Figure 23</b> : Profil électrophorétique des fractions V, XI, XIII réduites ou non au $\beta$ -mercaptoéthanol.....	68
<b>Figure 24</b> : Chromatogramme de la purification de la fraction culot 40% sur colonne d'échange d'anion Q Sepharose.....	69
<b>Figure 25</b> : Profil électrophorétique des fractions issues de la chromatographie en échange d'anion pour le culot 40%.....	69
<b>Figure 26</b> : Electrophorèse bidimensionnelle du mélange des protéines purifiées à partir d'extrait brut d'arachides grillées répertoriées dans le tableau 6.....	71
<b>Figure 27</b> : Immunoréactivité des allergènes purifiés exprimées en % de la réponse IgE spécifique de l'arachide brute.....	89
<b>Figure 28</b> : Profil de la réponse des sous classes des IgG (1, 2, 3, 4) et des IgE contre les allergènes majeurs de l'arachide pour les différentes classes cliniques des patients.....	94
<b>Figure 29</b> : Profil de la réponse des sous classes des IgG (1, 2, 3, 4) et des IgE contre les allergènes majeurs de l'arachide pour les différentes classes cliniques des patients.....	96
<b>Figure 30</b> : Courbes de dilution réalisées avec 4 sérums sur les deux formats de dosage : arachide brute immobilisée et arachide brute marquée à l'ACHÉ.....	99

<b>Figure 31</b> : Réponse exprimée en unité d'absorbance (414 nm) des 80 sérums de clinique légère, modérée, sévère, nsp, avec les allergènes traceurs : Ara h 1-AChE, Ara h 2- AChE, Ara h 6-AChE, polymère globuline 11S- AChE.....	103
--	-----

## CHAPITRE 2

<b>Figure 32</b> : Profil électrophorétique des globulines 11S purifiées sur colonne phase inverse. ....	114
<b>Figure 33</b> : Electrophorèses bidimensionnelles réalisées à partir des différentes fractions de globulines 11S purifiées.....	115
<b>Figure 34</b> : Représentation de la réponse IgE spécifique moyenne contre les différents fragments de globulines 11S purifiés. ....	119
<b>Figure 35</b> : Alignement des fragments de Gly1 purifiés par rapport à la protéine non maturée .....	120
<b>Figure 36</b> : Electrophorèses bidimensionnelles reconstituées à partir des différentes isoformes d'Ara h 2 purifiées. ....	127
<b>Figure 37</b> : Alignements formatés de la protéine mature dérivée des 10 clones d'Ara h 2 séquencés par Hales et <i>al.</i> (2004) .....	128
<b>Figure 38</b> : Immunoréactivité des différentes isoformes d'Ara h 2 purifiées .....	129
<b>Figure 39</b> : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE par les isoformes d'Ara h 2 grillées.....	130
<b>Figure 40</b> : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE par les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, natifs ou réduits .....	132
<b>Figure 41</b> : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 6-AChE par les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, natifs ou réduits. ....	133
<b>Figure 42</b> : Chromatogramme du suivi de l'hydrolyse 1h et 4h d'Ara h 2 .....	135
<b>Figure 43</b> : Alignement des peptides obtenus à la suite de l'hydrolyse d'Ara h 2 par la trypsine.....	140
<b>Figure 44</b> : Immunoréactivité des fragments d'hydrolyse d'Ara h 2 purifiés.....	141
<b>Figure 45</b> : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2 par les fractions d'hydrolyse d'Ara h 2 (sérum 44)..	143
<b>Figure 46</b> : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2 par les fractions d'hydrolyse d'Ara h 2 (sérum 51)..	144

## CHAPITRE 3

<b>Figure 47</b> : Profil électrophorétique et immuno-empreinte des différents extraits d'arachides. ....	156
<b>Figure 48</b> : Profil électrophorétique et immuno-empreinte des différents allergènes purifiées (Ara h 1 et Ara h 2). ....	158
<b>Figure 49</b> : Analyse de la réponse IgE contre les différents extraits protéiques d'arachide.. ....	159
<b>Figure 50</b> : Courbes d'inhibition de la liaison IgE spécifique à l'extrait d'arachides crues immobilisées obtenues pour un sérum (393).. ....	161
<b>Figure 51</b> : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE immobilisées au traceur Ara h 1 ou au traceur Ara h 2 par des concentrations croissantes d'Ara h 1 ou d'Ara h 2 (cru, grillé ou bouilli) purifiés obtenues avec le sérum 393 .....	162
<b>Figure 52</b> : Profil électrophorétique des extraits d'arachides grillées, crues et beurre d'arachide avant et après digestion gastrique et gastro-duodénale. ....	183
<b>Figure 53</b> : Electrophorèses des prélèvements d'Ara h 1 au cours de la digestion gastrique et de la digestion gastro-duodénale. ....	185
<b>Figure 54</b> : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques du sérum 2205 à l'Ara h 1 immobilisé par Ara h 1 intact, après 120 min de digestion gastrique et 120 minutes de digestion gastro-duodénale.....	187
<b>Figure 55</b> : Electrophorèses des prélèvements gastriques <i>in vivo</i> réalisés sur 2 volontaires .....	188
<b>Figure 56</b> : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques du sérum 2209 à l'extrait d'arachide crue par des concentrations croissantes de digesta gastriques <i>in vivo</i> . ....	194
<b>Figure 57</b> : Courbes d'inhibition de la liaison des allergènes marqués aux IgE immobilisées par des concentrations croissantes de digesta gastriques <i>in vivo</i> .....	206
<b>Figure 58</b> : Electrophorèses des prélèvements gastriques <i>in vivo</i> réalisées sur 3 volontaires. ....	207
<b>Figure 59</b> : Courbes d'inhibition de la liaison des caséines aux IgE spécifiques par des digesta gastriques de lait. ....	207

# TABLE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION

<b>Tableau 1</b> : Classification de Gell et Coombs (1963) des phénomènes allergiques.....	3
<b>Tableau 2</b> : Subdivision de l'hypersensibilité de type IV médicamenteuse.....	4
<b>Tableau 3</b> : Effets physiologiques des médiateurs libérés par les mastocytes.....	7
<b>Tableau 4</b> : Les différents types des symptômes gastro-intestinaux associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques .....	10
<b>Tableau 5</b> : Les différents types des symptômes cutanés associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques.....	11
<b>Tableau 6</b> : Prévalence de l'allergie à l'arachide parmi des populations de sujets atopiques .....	14

## CHAPITRE 1

<b>Tableau 7</b> : Différents tampons d'extraction testés lors de l'extraction protéique de l'arachide.....	46
<b>Tableau 8</b> : Quantité protéique obtenue avec les 7 tampons d'extraction.....	54
<b>Tableau 9</b> : Identification des spots protéiques du gel bidimensionnel de la figure 3.....	59
<b>Tableau 10</b> : Fractionnement HPLC réalisé à partir des différents groupes protéiques obtenus en chromatographie d'échange d'anion.....	67
<b>Tableau 11</b> : Masses moléculaires obtenues par spectrométrie de masse MALDI TOF des différentes fractions purifiées sur chromatographie en phase inverse. ....	68
<b>Tableau 12</b> : Caractérisation biochimique des protéines purifiées et retenues pour les analyses de la réponse IgE spécifique par protéomique et séquençage des acides aminés N-terminaux. ....	70
<b>Tableau 13</b> : Répartition des âges en fonction des différentes classes cliniques.....	76
<b>Tableau 14</b> : Description clinique des 80 sérums de patients allergiques à l'arachide utilisés.....	77
<b>Tableau 15</b> : Valeurs moyenne et médiane des IgE spécifiques, pour les 80 sérums testés et regroupés suivant les 4 classes cliniques évaluées pour chaque allergène sélectionné.....	87
<b>Tableau 16</b> : Etude de la capacité de capture d'IgE spécifique du format de dosage par capture des IgE en fonction du ratio IgE spécifique/IgE totales déterminés à l'aide du format de dosage par immobilisation de l'arachide brute. ....	100
<b>Tableau 17</b> : Etude de la réponse IgE spécifique anti-arachide brute de 62 sérums avec le dosage par capture des IgE de sérums présentant une réponse très faible ou nulle avec le dosage par immobilisation de l'arachide brute.....	101
<b>Tableau 18</b> : Comparaison des valeurs des concentrations nécessaire pour inhiber 50% de la liaison (IC50) des IgE à l'arachide brute immobilisée (format classique) ou à l'arachide brute-AChE en solution (nouveau format).....	102
<b>Tableau 19</b> : Dosage des IgE spécifiques (en UI.ml <sup>-1</sup> ) et résultats des tests cutanés (diamètre de la papule en mm) pour une population de 16 patients. ....	107

## CHAPITRE 2

<b>Tableau 20</b> : Caractéristiques des fragments de globulines 11S isolés. ....	116
<b>Tableau 21</b> : Fréquence de reconnaissance des différents fragments de globulines 11S. ....	118
<b>Tableau 22</b> : Fragments peptidiques obtenus à la suite de la deuxième purification des hydrolysats tryptiques d'Ara h 2 sur colonne phase inverse C2/C18.....	136
<b>Tableau 23</b> : Caractérisations des peptides générés au cours de l'hydrolyse tryptique d'Ara h 2. ....	137

### CHAPITRE 3

<b>Tableau 24</b> : Résultats des tests statistiques (test de Friedmann et corrélation des rangs de Spearman) de comparaison des différents extraits bruts d'arachide.....	159
<b>Tableau 25</b> : Valeurs d'IC50 obtenues pour les extraits d'arachides crues et grillées et de beurre d'arachide à l'aide de sérums de 5 patients allergiques à l'arachide.....	184
<b>Tableau 26</b> : IC50 obtenues avec les digesta gastriques et gastro-duodénaux d'Ara h 1. ....	187
<b>Tableau 27</b> : IC50 obtenues pour les digesta gastriques <i>in vivo</i> d'arachide.....	191
<b>Tableau 28</b> : Concentrations de blg contenue dans les échantillons de lait et de yaourt.....	198
<b>Tableau 29</b> : IC50 obtenues avec les digesta gastriques et gastro-duodénaux du lait et du yaourt....	200
<b>Tableau 30</b> : Concentrations des caséines contenues dans les échantillons de lait et de yaourt .....	201
<b>Tableau 31</b> : IC50 obtenues avec les digesta gastriques et gastro-duodénaux du lait et du yaourt....	202
<b>Tableau 32</b> : IC50 obtenues avec les digesta gastriques <i>in vivo</i> du lait .....	208

Le travail présenté dans cette thèse a pour fil conducteur l'allergie à l'arachide. Effectuée au sein du laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, cette étude s'est inscrite dans le cadre du programme Européen Allergest qui s'intéresse à l'effet de la digestion sur l'allergénicité des aliments évaluée sur deux modèles : l'arachide et le lait de vache.

Un premier objectif était de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents allergènes de l'arachide. Une telle démarche a fait appel autant à des méthodologies biochimiques de purification et de caractérisation des protéines qu'à des techniques immunologiques analysant la liaison d'anticorps spécifiques et particulièrement d'immunoglobulines de type IgE humaines aux antigènes immobilisés. Grâce à une collaboration avec le Service du Pr. Scheinmann (Service de Pédiatrie Allergologie Pneumologie, Hôpital Necker, Paris), nous avons pu bénéficier d'un large échantillonnage de sérums de patients, représentatif de la population française allergique.

Dans une seconde étape, nous avons étudié l'influence de la dégradation enzymatique sur l'immunoréactivité de deux modèles allergéniques précédemment identifiés et avons cherché à caractériser les épitopes conservés lors d'hydrolyses contrôlées.

Le dernier objectif, thématique principale de ce programme Européen, a été l'analyse, de façon plus globale, de la résistance des allergènes de l'arachide lors des traitements thermiques et des processus digestifs. Une étude comparative est alors menée avec le comportement du lait lors des mêmes procédés. Les différences de résistance aux dégradations pourrait permettre de préciser le potentiel allergénique de l'arachide.

Le chapitre de l'allergie alimentaire a longtemps été considéré par la plupart des médecins comme confus et controversé. En effet, l'allergie alimentaire peut revêtir des manifestations diverses et variées aux origines imprécises : la symptomatologie décrite est large et les composants suspects sont difficiles à identifier du fait de la diversité alimentaire. Le diagnostic de l'allergie repose donc sur la description des manifestations cliniques et la confirmation des aliments ou protéines impliquées.

De nos jours, avec la consommation d'aliments nouveaux de composition de plus en plus complexe, il est essentiel de mettre au point à la fois des techniques de détections des allergènes fiables et non contraignantes pour les patients afin d'éviter les tests *in vivo*.

## I. L'allergie

### 1. Les définitions : Petites histoires et grandes dates

« Vieux comme le monde », est une expression populaire que l'on pourrait utiliser pour les phénomènes d'allergie. En effet, le premier allergique connu aurait été Ménes, Pharaon de la 1<sup>ère</sup> dynastie en l'an 2650 avant JC. Allergique au venin d'Hyménoptère, il serait mort à la suite d'une piqûre de guêpe. Des personnages célèbres, tels qu'Hippocrate (cinquième siècle avant JC.) et Galen (second siècle après JC.) ont reconnu que le lait de vache ou de chèvre pouvait causer des troubles digestifs et de l'urticaire. Ils marqueront ainsi l'Histoire...de l'allergie.

Mais il faut attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que le phénomène d'anaphylaxie soit décrit et que l'allergie soit clairement définie. En effet, en 1902, les Français Richet et Portier décrivent l'induction expérimentale d'une hypersensibilité fatale chez le chien. Leurs expériences portent sur l'administration successive à un chien de doses non toxiques de venin d'anémones de mer dans un but de désensibilisation préventive. Cependant, lors de l'injection d'une faible dose de poison, l'animal supporte bien l'agression mais quelques semaines plus tard, lors de la réinjection de la même dose de poison et contrairement aux prévisions, l'animal réagit violemment et meurt. Pour ce phénomène reproductible, ils proposent alors le terme d'anaphylaxie, dérivé des mots grecs « ana » pour contraire et « phylaxis » pour protection.

Dès 1906, le terme « allergie » (*allos*, autre, *ergon*, action) a été défini par Von Pirquet comme « une altération de la capacité de l'organisme de réagir à une substance étrangère ». Cette définition est extrêmement large et inclut toutes les réactions immunologiques.

L'allergie est actuellement définie de manière plus restreinte comme « une maladie consécutive à une réponse du système immunitaire à un antigène inoffensif ». Il ne faut pas la confondre avec des réactions toxiques, ni avec des réactions non toxiques mais également non immunologiques (intolérances alimentaires dont l'exemple est l'intolérance au lactose) d'origine pharmacologique, enzymatique ou psychosomatique.

L'allergie constitue une des classes de réponses immunitaires appelées réactions d'hypersensibilité. Ce sont des réponses immunitaires néfastes qui induisent des lésions tissulaires et peuvent causer de graves maladies.

## 2. La classification de Gell et Coombs

Gell et Coombs décrivent en 1963 une classification en quatre groupes des réactions d'hypersensibilité (tableau 1). Depuis, nos connaissances ont évolué et il faut noter l'imbrication fréquente des divers types. Cette classification reste cependant majoritairement admise en dépit de modifications proposées, notamment par l'addition d'une nouvelle classe.

**Tableau 1 : Classification de Gell et Coombs (1963) des phénomènes allergiques.**

Type d'hypersensibilité	I	II	III	IV
Type de réactions	Médiée par les IgE	Cytotoxique	Complexes immuns	Cellulaire
Délai de déclenchement	Immédiat	Semi-retardé (4 à 8 heures)	Semi-retardé (quelques heures)	Retardé (1 à 3 j.)
Maladies et phénomènes courants	Anaphylaxie, asthme, rhinite, eczéma atopique, choc anaphylactique	Destruction des cellules sanguines par allergie médicamenteuse	Maladie sérique, pneumopathies à précipines	Dermatites, eczéma de contact, allergie microbienne, rejet de greffes
Effecteurs	IgE, mastocytes, basophiles	IgG ou IgM, cellules K	IgG, IgM	Lymphocytes T, macrophages
Médiateurs	Histamine, leucotriènes, Platelet Activating Factor (PAF)	Protéines du complément	Anticorps, complément, plaquettes, neutrophiles	Lymphokines

En effet, récemment, Rajan (2003) a proposé un cinquième groupe de réaction d'hypersensibilité, non répertoriée dans la classification de Gell et Coombs. Il s'agit d'une stratégie utilisée par l'organisme contre une classe d'agents infectieux aux effets délétères. Cela concerne les agents indigestibles, extracellulaires tels que *Mycobacterium tuberculosis*. Les mécanismes effecteurs, menés par l'immunité innée (cytokines de type 1 ou de type 2), font intervenir la formation de granulomes qui encapsulent et isolent le pathogène. L'hypersensibilité médicamenteuse de type IV a également été récemment divisée en 4 sous-classes (a, b, c, d) (Pichler, 2003).

**Tableau 2 : subdivision de l'hypersensibilité de type IV médicamenteuse (Pichler, 2003). CTL : cellules T cytotoxiques.**

Sous-classe hypersensibilité	Type de réponse immunitaire	Caractéristiques pathologiques	Symptômes cliniques	Type cellulaire
<b>IVa</b>	Th1 (IFN- $\gamma$ )	Activation des monocytes	eczéma	Cellules T
<b>IVb</b>	Th2 (IL-5 et IL-4)	Inflammation éosinophilique	Exanthème maculopapulaire, exanthème bulleux	Cellules T
<b>IVc</b>	CTL (perforine, granzyme B)	Elimination des cellules médiées par les CD4 et CD8	Exanthème maculopapulaire, eczéma, exanthème bulleux, exanthème pustulaire	Cellules T
<b>IVd</b>	Cellules T (IL-8)	Recrutement et activation des neutrophiles	Exanthème pustulaire	Cellules T

Selon la classification de Gell et Combs, l'allergie est souvent assimilée à une réaction d'hypersensibilité de type I, dite immédiate, IgE-dépendante. Cette réaction a pour origine l'activation, par un antigène spécifique, de mastocytes sensibilisés par des IgE, aboutissant à la libération des médiateurs chimiques de l'inflammation. C'est essentiellement à ce type de réaction que nous allons nous intéresser par la suite. Il faut toutefois noter, pour ce type d'hypersensibilité de type I, l'existence de réactions retardées, particulièrement dans les dermatites atopiques et également durant les manifestations digestives, lors d'allergie au lait de vache.

### 3. Mécanismes de l'allergie

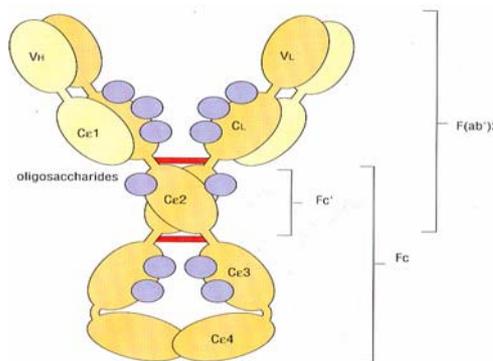
Une cascade complexe d'événements se déroule entre le premier contact de la muqueuse avec l'allergène et l'apparition des symptômes allergiques liés au deuxième contact avec le même allergène.

#### a) Les IgE et les récepteurs aux IgE

Les IgE sont essentiellement produites au niveau des principaux sites d'infection parasitaire : la peau, les poumons et l'intestin. Les réactions induites par les IgE rencontrées lors de

réactions allergiques (inflammation, bronchoconstriction, sécrétion de mucus, vomissements et diarrhées) représentent en fait les changements anatomiques et physiologiques normalement mis en œuvre pour lutter contre les parasites, rôle « normal » des IgE.

La structure générale des IgE est analogue à celle décrite pour les quatre classes d'immunoglobulines. Il s'agit de glycoprotéines composées de 4 chaînes, dont deux chaînes lourdes (type  $\epsilon$ ) et deux chaînes légères réunies par des ponts disulfures, de masse relative 188 kDa, comportant une proportion importante (12%) de résidus glucidiques. Les chaînes lourdes sont composées de quatre domaines constants ( $C\epsilon$ ), le domaine  $C\epsilon 3$  permettant la liaison des IgE sur leur récepteur (figure 2).



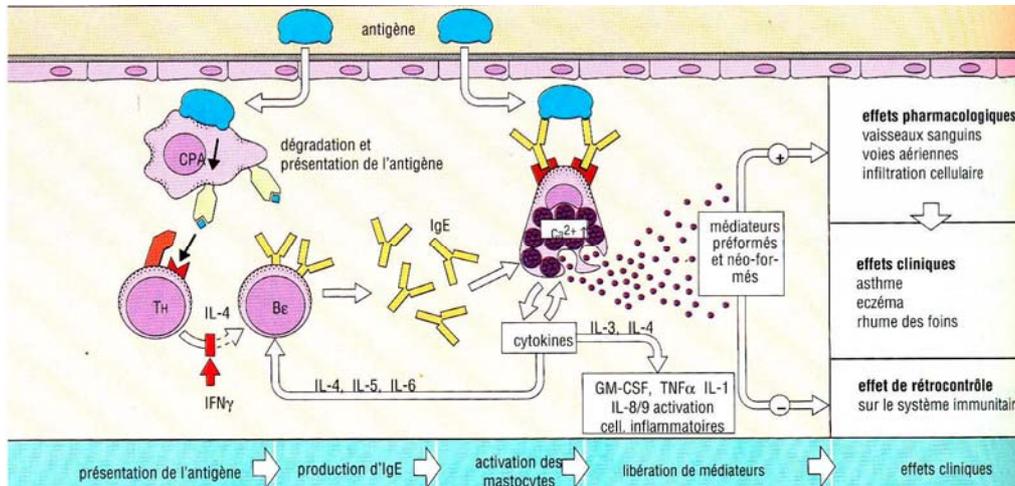
**Figure 1 : Structure de l'IgE humaine**

Les récepteurs aux IgE sont présents sur les cellules effectrices telles que les mastocytes et les basophiles. Il existe deux types de récepteurs aux IgE : un récepteur de forte affinité ( $K_a = 10^{10} M^{-1}$ ), le  $RF\epsilon I$ , et un récepteur de faible affinité, le CD23 ou  $RF\epsilon II$ . Le récepteur de forte affinité est impliqué dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, du fait de sa présence à la surface des mastocytes tissulaires et des basophiles circulants, mais il est également présent sur les cellules de Langherans et les éosinophiles. Le CD23 est exprimé par les cellules B, les macrophages, les éosinophiles, les plaquettes, les cellules NK (Natural Killer), les cellules de Langherans et les cellules épithéliales.

La concentration sérique des IgE circulantes est faible (de l'ordre de  $0,4 mg.ml^{-1}$ ). La demi-vie sérique des IgE est brève (environ 2,5 jours) mais elles persistent beaucoup plus longtemps à la surface des mastocytes sensibilisés.

### **b) La phase de sensibilisation et la production d'IgE**

La physiologie de l'allergie alimentaire répond à deux phases successives (figure 2).



**Figure 2 : induction et mécanismes effecteurs de l'hypersensibilité de type I (d'après Roitt, Brostoff, Male, 1994).**

La première phase de l'allergie est une phase « silencieuse ». Elle se traduit par la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B à la suite d'un premier contact avec l'antigène, qui est alors défini comme allergène. On parle de phase de sensibilisation. La production des IgE dépend directement de l'interaction entre les cellules B et T et notamment de la production d'IL-4 (interleukine 4), IL5 (interleukine 5), IL6 (interleukine 6), IL10 (interleukine 10) et d'IL-13 (interleukine 13) par les cellules T auxiliaires de type 2 (TH<sub>2</sub>). En effet, ces cytokines sont responsables de la commutation isotypique vers les IgE. L'induction d'une réponse TH<sub>2</sub> dépend de nombreux facteurs tels que la prédisposition génétique (atopie), l'environnement, l'hygiène...

Les IgE fixées sur leur récepteur attendent un second contact avec l'allergène : aucun signe clinique n'est apparent.

### **c) La phase de déclenchement**

Lors du second contact avec l'allergène, celui-ci va être reconnu par les IgE fixées sur les récepteurs membranaires RFcεI des mastocytes et des basophiles. Il se fixe par deux épitopes distincts (définition page 24) sur deux IgE présentes à la surface membranaire, créant ainsi un pontage des IgE. Ce pontage induit l'activation des cellules effectrices (mastocytes et

basophiles) par induction d'un flux calcique qui entraîne la libération d'un ensemble de médiateurs (figure 3):

- des médiateurs préformés, en particulier l'histamine qui résulte de l'exocytose du contenu granulaire, et des protéases.
- des médiateurs néoformés (prostaglandine D2, leucotriène C4 et facteur d'activation des plaquettes) synthétisés à partir de l'acide arachidonique.

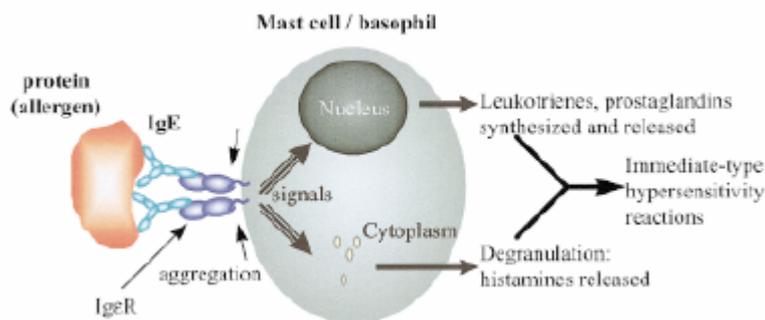


Figure 3 : médiateurs libérés par les mastocytes et basophiles au cours de l'hypersensibilité immédiate suite aux signaux intracellulaires engendrés par les récepteurs aux IgE.

Ces médiateurs conduisent à l'apparition rapide de signes cliniques de la réaction d'hypersensibilité immédiate, c'est-à-dire dilatation des vaisseaux, œdème muqueux, contraction du muscle lisse bronchique... (tableau 3).

Tableau 3 : Effets physiologiques des médiateurs libérés par les mastocytes.

Effets chimiotactiques	
Cytokines (IL-5, TNF $\alpha$ , IL-8)	Neutrophiles, éosinophiles, basophiles
LTB <sub>4</sub> , PAF	Basophiles
Effets inflammatoires	
Histamine	Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire
PAF	Microthrombus
Tryptase	Enzyme protéolytique qui active C3 (composant du complément)
Kininogénase	Kinine, vasodilatation, oedème
Effets spasmogènes	
Histamine	Contraction du muscle lisse bronchique
PGD <sub>2</sub>	
LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub>	Sécrétion de mucus

Les mastocytes et les basophiles peuvent également sécréter diverses cytokines, notamment l'IL-4 et IL-5, dont la libération via les IgE engendre respectivement l'infiltration et

l'activation des leucocytes, notamment les éosinophiles, responsables de la phase tardive de la réaction allergique.

## **II. La place de l'allergie alimentaire**

### **1. Importance de l'allergie alimentaire**

L'incidence de l'allergie a beaucoup augmenté durant ces deux dernières décennies. Les allergies représentent un véritable problème de santé publique, aussi bien pour les gênes, perturbations et risques de pathologies graves qu'elles entraînent dans la vie des patients, que par les coûts de santé qu'elles engendrent.

L'épidémiologie de l'allergie alimentaire est loin d'être clairement établie. En dépit du nombre impressionnant d'études publiées sur l'allergie alimentaire, ni son incidence ni sa prévalence ne sont actuellement bien connues, et ceci en raison de l'imbrication de nombreux paramètres et de l'absence de critères d'analyse objectivement définis. D'après l'étude de Vandenas (1993), plus de 40% des Nord-Américains interrogés prétendent avoir souffert de « réactions adverses alimentaires ». En Suède, une étude exhaustive montre qu'environ 30% des enfants rendent visite à un médecin pour une suspicion d'allergie alimentaire (Hanson et Telemo, 1997). Il semble exister une disproportion importante entre la suspicion d'une allergie alimentaire et l'allergie avérée. Ceci est dû en premier lieu à la perception des parents, quant à une réaction allergique chez leurs enfants. La prévalence ainsi évaluée est beaucoup plus importante que la réalité. Ainsi, au Colorado, lors d'un suivi pédiatrique de 430 nouveaux-nés, sur les 133 enfants suspectés d'avoir des allergies adverses aux aliments, seulement 38 (soit 8%) présentaient des symptômes confirmés par des tests oraux de provocations (Bock, 1987). De même, une étude allemande montre que dans une population sélectionnée d'adultes, 10% des patients rapportent des réactions adverses alimentaires, alors qu'après des tests en aveugle, seulement 2% sont cliniquement affectés (Jansen *et al.*, 1994). Ces études soulignent clairement que la majorité des réactions allergiques alimentaires suspectées sont surévaluées par rapport aux allergies alimentaires cliniquement prouvées. En général, le consensus de la littérature médicale concernant la prévalence des réactions adverses alimentaires se situe approximativement entre 2 et 8% chez les enfants et 1% chez les adultes (Sampson et Burks, 1996).

Cependant, les études diffèrent également par la population, la taille de l'échantillonnage et les tranches d'âge considérées. Une étude concernant 866 enfants finlandais âgés de 1 à 6 ans est souvent citée à ce sujet (Kajosaari, 1982). Cet auteur rapporte une incidence de l'allergie alimentaire chez 19% des enfants à l'âge de 1 an. Cette incidence atteint 27% à 3 ans, 10% de ces enfants étant sensibles à plus de 3 aliments. Une étude de Sampson *et al.* (1999) portant sur 480 naissances suivies jusqu'à l'âge de 3 ans rapporte 28% de cas d'allergie alimentaire. La plupart des allergies alimentaires sont acquises vers l'âge d'un à deux ans, avec un pic de prévalence de 6% à 8% à l'âge d'un an. Ce pic diminue progressivement pour se stabiliser à 1% ou 2% à l'âge adulte pour la population américaine (Skolnick *et al.*, 2001). Approximativement 5% des enfants de moins de 3 ans et 1,5% de la population générale présentent des réactions allergiques alimentaires, soulignant le fait que près de 4 millions d'Américains souffrent d'allergies alimentaires (Sampson, 1997). En France, l'hypersensibilité alimentaire touche 3,5% de la population française générale, soit près de 2 millions de personnes (Kanny *et al.*, 2001). L'allergie alimentaire médiée par les IgE est principalement l'apanage des nourrissons et des jeunes enfants. La prévalence est moins élevée chez les adultes (1 à 2% contre 2 à 8% pour les jeunes enfants) (Sampson et Burks, 1996).

La prévalence de l'allergie alimentaire dépend également des différences socio-culturelles entre pays, de la multiplicité des allergènes et des modes alimentaires. Certaines études épidémiologiques ont démontré, par exemple, que la prévalence des maladies atopiques est plus faible chez les enfants des pays de l'Europe Centrale et de l'Europe de l'Est que chez les enfants de l'Europe Occidentale (de Blay *et al.*, 2004). Les allergènes alimentaires fréquemment rencontrés chez l'enfant sont dans 90% des cas, le lait (incidence 2,5%), l'œuf (1,3%), la cacahuète (0,5%), le soja (Burks *et al.*, 2001). Chez l'adulte, ce sont pour 85% des cas, la cacahuète, les noix, le poisson et les fruits de mer (Burks *et al.*, 2001) (Sampson, 1999). Par ailleurs, il faut noter l'émergence de nouveaux allergènes alimentaires tels que le kiwi, le sésame ou encore la papaye. Le changement important de l'environnement alimentaire lors des trente dernières années avec l'utilisation de nouvelles techniques industrielles agricoles favorise le développement de nouveaux allergènes et potentialise l'allergénicité des aliments (Moneret-Vautrin, 1999).

La complexité des critères environnementaux constitue une difficulté majeure pour l'évaluation des allergènes alimentaires tout comme la multiplicité des symptômes. En effet, la prise en compte de symptômes particuliers influence le diagnostic de l'allergie alimentaire.

## 2. Une symptomatologie variée

Les différents symptômes retrouvés lors des réactions allergiques alimentaires sont analysées d'après deux revues faisant état de nombreuses études sur ce sujet (Sampson, 1999) (Sampson, 2003) et sont multiples : cutanés (urticaire, œdème localisé, eczéma), respiratoires (asthme, rhinite, gêne laryngée), gastro-intestinaux (vomissements, douleurs abdominales, diarrhée), ophtalmologiques (conjonctivite). L'allergie peut se manifester sous des formes plus graves comme l'œdème de Quincke ou le choc anaphylactique (réactions systémiques généralisées).

### a) Sympt mes gastro-intestinaux

Les symptômes gastro-intestinaux se retrouvent dans un peu plus de 50% des cas d'allergie alimentaire. Ils ont été classifiés en hypersensibilités exclusivement médiées par les IgE, partiellement médiées par les IgE ou exclusivement à médiation cellulaire comme nous le détaillons dans le tableau suivant.

**Tableau 4 : les différents types de sympt mes gastro-intestinaux associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques.**

	Type	manifestations
IgE dépendantes	Hypersensibilité immédiate	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nausées, douleurs abdominales, colique, vomissements, diarrhées</li> <li>Faible appétit, faible poids, malabsorption</li> <li>Désensibilisation des mastocytes</li> </ul>
	Syndrome oral allergique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Picotement et angiodème des lèvres, de la langue, du palais, de la gorge</li> <li>Activation mastocytaire</li> </ul>
Mixtes IgE et non IgE dépendantes	Oesophagite eosinophilique, gastrite, gastro-entérite allergique	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reflux gastrique, douleur abdominale, anorexie, retard de croissance, perte de poids</li> <li>Infiltration dans l'œsophage, l'estomac ou la barrière intestinale</li> </ul>
Non IgE dépendantes	Syndrome d'entérocolite	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vomissements, diarrhées, déshydratation (dans les premiers mois, alimentation au lait de vache et soja)</li> <li>Sécrétion d'antigène spécifique de TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>
	Proctitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anémie (dans les premiers mois, alimentation au lait de vache et soja)</li> <li>Infiltration d'éosinophiles dans la paroi intestinale</li> </ul>
	Entéropathie	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhées, pas de prise de poids (dans les premiers mois, alimentation au lait de vache)</li> <li>Sécrétion d'IgA et IgG spécifiques</li> </ul>
	Maladie coeliaque	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhées grasses, dénutrition (alimentation au gluten)</li> <li>Forte infiltration cellulaire</li> </ul>

### **b) Sympt mes cutanés**

Les symptômes cutanés se retrouvent dans environ 60% des cas d'allergie alimentaire et sont classifiés selon le même principe que les symptômes gastro-intestinaux (tableau 5).

**Tableau 5 : les différents types des sympt mes cutanés associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques.**

	Type	manifestations
IgE dépendantes	Angiodème, urticaire aigu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation des mastocytes circulants, possédants des IgE à leur surface</li> <li>• Essentiellement le lait, l'œuf, les noix et cacahuètes</li> </ul>
Mixtes et non IgE dépendantes	Dermatite atopique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prurit, association à l'asthme et à la rhinite allergique</li> <li>• Rôle des cellules de Langherans de la peau, présentant l'allergène via des IgE à leur surface ; activation des cellules T et sécrétion de cytokines de type Th2</li> </ul>
Non IgE dépendantes	Dermatite associée à l'entéropathie (gluten)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prurit papulo-vésiculaire</li> <li>• Dépôt d'IgA et présence de neutrophiles à la jonction derme-épiderme</li> </ul>

### **c) Sympt mes respiratoires**

Les symptômes respiratoires se retrouvent dans environ 30% des cas d'allergie alimentaire. Les réactions IgE-dépendantes, les plus fréquentes, atteignent les voies respiratoires supérieures (rhino-conjonctivite allergique) ou inférieures (asthme, bronchospasme). Pour les réactions mixtes, les symptômes retrouvés sont la toux, la dyspnée et l'éternuement. Pour les réactions non IgE dépendantes, les manifestations les plus courantes sont les pneumonies associées à des infiltrations pulmonaires.

### **d) Anaphylaxies généralisées**

Les formes graves d'allergie sont l'anaphylaxie (atteinte simultanée de plusieurs « organes cibles »), le choc anaphylactique (symptômes précédents associés à une chute de la pression sanguine, sensation de mort imminente, troubles neurologiques), les menaces de mort subite et les décès soudains (Fries, 1982) (Sampson et *al.*, 1992). De nombreux rapports sur les cas d'anaphylaxies, survenues suite à une ingestion alimentaire, montrent l'amplitude du problème (Bock et *al.*, 2001). En France, en 2002, 107 cas d'anaphylaxie sévère ont été enregistrés : 59,8% de chocs anaphylactiques (dont un fatal), 18,7% de réactions systémiques,

15,9% d'œdèmes laryngés et 5,6% d'asthmes aiguës sévères (dont un fatal) (Moneret-Vautrin et *al.*, 2004). De 1983 et 1987, certains investigateurs ont observé une fréquence d'anaphylaxie de 30 pour 100 patients sur une année, lors d'une étude réalisée à l'hôpital County Olmstead à Minn (Yocum et *al.*, 1999). Dans leur service d'urgence, les réactions allergiques alimentaires sont les principales causes de réactions anaphylactiques. En extrapolant les données, nous pouvons prédire la survenue chaque année aux Etats-Unis d'environ 29000 épisodes anaphylactiques, dus aux allergies alimentaires, induisant environ 150 décès. Une étude danoise rapporte un taux de décès de 5% au sein de leur population (Sorensen et *al.*, 1989).

Les symptômes cutanés, respiratoires et gastro-intestinaux, s'accompagnent de symptômes cardio-vasculaires (hypotension, collapse vasculaire, dysrythmie cardiaque), probablement induits par une dégranulation massive des mastocytes.

Une étude de Bock et *al.* (2001) rapporte ce type de réaction avec décès chez 32 sujets répartis en 2 groupes de 2 à 33 ans. Il n'y a pas de différence de fréquence et d'incidence entre les sexes des individus. Les aliments incriminés sont pour le groupe 1, l'arachide (14/21, 67%) et les noix (7/21, 33%) et pour le groupe 2, l'arachide (6/11, 55%), les noix (3/11, 27%), le lait (1/11, 9%) et le poisson (1/11, 9%).

### **3. Importance de l'allergie à l'arachide**

Cette dernière étude souligne la prépondérance de l'arachide dans les allergies alimentaires dites sévères. La gravité des symptômes est l'un des points préoccupants de l'allergie à l'arachide. En effet, l'arachide est la cause majeure des décès et des dangers de mort subite par allergie alimentaire. Dutau et *al.* (1994) constate notamment que sur 70 cas d'anaphylaxie alimentaire, 28 sont dues à l'arachide (40% des allergies alimentaires) dont 10 conduisant au décès du patient (36% des allergies à l'arachide). L'allergie à l'arachide serait responsable de 23 à 47% des réactions anaphylactiques induites par l'alimentation (Sicherer, 2002). Enfin l'étude de Hourihane et *al.* (1997b) réalisée sur 662 individus allergiques à l'arachide, rapporte 82 hospitalisations d'urgence, ce qui représente plus d'un patient sur 10. De plus, après l'âge de 11 ans, et surtout après l'âge de 16 ans et chez les adultes, les symptômes sont graves dans au moins 50% des cas.

**a) Par sa symptomatologie sévère**

Outre les manifestations graves, les symptômes de l'allergie à l'arachide sont ceux de l'allergie immédiate, à savoir des symptômes digestifs, respiratoires, cutanés ou muqueux. Tous ces symptômes peuvent être observés après ingestion de l'allergène mais aussi inhalation ou encore contact cutané.

Près de la moitié des réactions cliniques impliquent plusieurs organes (Sicherer, 2002) : 2 organes dans 32% des cas, 3 organes (13%) et 4 organes (1%) (Sicherer et *al.*, 2001).

Les symptômes digestifs les plus fréquents sont les nausées, les vomissements avec douleurs oesophagiennes et/ou gastriques, les douleurs abdominales avec crampes, la diarrhée. Les patients allergiques à l'arachide signalent souvent un dégoût, voire une répulsion pour cet aliment, ce qui, ultérieurement, peut leur rendre service en facilitant sa reconnaissance. Toutefois, il ne faut pas compter sur cette faculté qui est inconstante. Globalement, on estime la fréquence des symptômes digestifs entre 27% et 75% des cas (Hourihane et *al.*, 1997b) (Sicherer et *al.*, 1998) (Moneret-Vautrin et *al.*, 1998).

Les symptômes respiratoires touchent l'ensemble des muqueuses depuis la muqueuse nasale jusqu'aux bronches. Ce sont les éternuements et la rhinorrhée, le spasme laryngé, les crises d'asthme qui peuvent être graves.

L'asthme est significativement plus fréquent au cours de l'allergie à l'arachide (13,6%) que dans les autres allergies alimentaires (7,6%) (Moneret-Vautrin et *al.*, 1998). Il en est de même pour l'œdème de Quincke (34,8% *vs* 14,4%). Les patients, atteints des formes graves d'allergie à l'arachide, ont presque toujours un asthme nécessitant un traitement de fond par les corticostéroïdes inhalés (Sampson et *al.*, 1992). Leur asthme est souvent instable (Sampson et *al.*, 1992).

Des signes respiratoires (rhinite, crise d'asthme) ont été signalés à l'ouverture de pots contenant du beurre de cacahuète, à la manipulation de cacahuètes grillées lors d'apéritifs ou à proximité de personnes consommant des cacahuètes (Fries, 1982).

La fréquence des symptômes respiratoires se situe aux alentours de 40% à 45% des cas (Sicherer et *al.*, 1998) (Hourihane et *al.*, 1997b) (Moneret-Vautrin et *al.*, 1998).

Généralement, les symptômes cutanés consistent en une urticaire généralisée, une urticaire péri-orale ou cervico-faciale, un œdème de Quincke, des poussées de dermatite atopique (Moneret-Vautrin et *al.*, 1998). L'eczéma est associé à l'allergie à l'arachide dans 37% des cas, tous âges confondus, plus souvent chez les enfants de 1 mois à 15 ans (48,5%) (Dutau et *al.*, 1996). Les symptômes cutanés sont présents dans 37% à 41% des cas. Ces symptômes,

notamment une urticaire localisée en particulier faciale, surviennent au contact direct des cacahuètes ou indirectement (contact ou baiser des parents qui en consomment) (Hourihane et *al.*, 1997b).

### **b) Par une forte fréquence et une faible rémission**

La fréquence de l'allergie à l'arachide associée à son caractère persistant constitue le second point préoccupant d'une telle pathologie qui représente tout de même 28% des cas d'allergie alimentaire (Moneret-Vautrin et *al.*, 1998).

L'hypersensibilité à l'arachide commence habituellement dans la jeune enfance et est considérée comme le prototype de l'allergie fixée, ne disparaissant pas avec le temps.

En effet, cette allergie, qui toucherait 1,3% de la population générale, arrive chez l'enfant dès l'âge de 5 ans au second rang, derrière l'œuf.

Björnsson et *al.* (1996) estiment, grâce à des RAST (Radio Allergo Sorbent Test), que 3% de la population est sensibilisé à l'arachide, cette étude étant menée en 1991/1992 sur 1397 adultes non sélectionnés âgés de 20 à 44 ans. Une étude similaire menée sur 12032 individus montre que 0,4% des enfants âgés de moins de 18 ans et que 0,7% des adultes sont touchés par l'allergie à l'arachide.

La prévalence de l'allergie alimentaire à l'arachide parmi une population de sujets atopiques est chiffrée de manière non exhaustive en tableau 6.

**Tableau 6 : Prévalence de l'allergie à l'arachide parmi des populations de sujets atopiques, DBPCFC (Double Blind Placebo Controlled Food Challenge), SAFT (Skin Application Food Test), SPT (Skin Prick Test).**

	Allergie à l'arachide	références
<b>91 patients avec dermatite atopique (âge &lt; 5 ans)</b>	34% (SAFT)	<i>Orangie et al., 1992</i>
<b>112 enfants avec dermatite atopique (5 mois à 13 ans)</b>	14% (questionnaire)	<i>Steinman et Potter, 1994</i>
<b>196 patients avec dermatite atopique</b>	49% (DBPCFC, n=41)	<i>Sampson et Ho, 1997</i>
<b>165 patients avec dermatite atopique</b>	33% (SPT) desquels 17/44 sont DBPCFC positif	<i>Burks et al., 1998(a)</i>

En France, chez 544 enfants âgés de moins de 15 ans, l'arachide (24%) arrive au second rang des aliments responsables d'allergies après l'œuf (36%), mais avant le lait de vache (8%), la moutarde (6%) et le poisson (4%) (Rance et *al.*, 1999). Par contre après l'âge de 3 ans, elle se place au premier rang (Bousquet et *al.*, 1998). Tous âges confondus, l'arachide et les noix

représentent les plus fréquents des allergènes alimentaires aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, et dans plusieurs pays d'Europe occidentale. Ainsi, en Espagne, sur 355 enfants atteints d'allergie alimentaire IgE-dépendante, l'arachide arrive au sixième rang (3,9%), loin derrière l'œuf (20,1%), le poisson (17,8%), le lait de vache (14,3%), et même les lentilles (5,9%), et la pêche (5,1%) (Crespo et *al.*, 1995). En effet, les habitudes culturelles font que les lentilles sont les premières légumineuses consommées dans la péninsule ibérique.

D'après l'étude de Sicherer et *al.* (2003), l'allergie à l'arachide affecte environ 1% de la population et présente une persistance à vie. Toutefois, Hourihane et *al.* (1998) ont observé récemment une évolution favorable dans quelques cas d'allergie à l'arachide. De plus, Skolnick et *al.* (2001) ont tout de même décrit qu'environ 20% des enfants acquièrent une tolérance à l'allergie à l'arachide.

### **c) Par des doses réactogènes faibles**

Le troisième point inquiétant de cette allergie est la difficulté d'obtenir une éviction stricte de l'arachide, pourtant indispensable. En effet, de nombreux aliments en contiennent de façon masquée et chez les sujets très sensibilisés, des traces suffisent au déclenchement d'une réaction (Morisset et *al.*, 2003).

La détermination de doses réactogènes pour les aliments allergéniques, et notamment l'arachide a donné lieu à de nombreuses études ces dernières années. La dose réactogène définit la dose en dessous de laquelle les consommateurs sensibilisés n'auraient pas de risque de développer des réactions allergiques. La distribution des doses réactogènes individuelles, qui provoque une réaction allergénique, est variable au sein d'une population de patients allergiques (Hansen et *al.*, 2003) (Hourihane et *al.*, 1997b) (Wensing et *al.*, 2002) (Norgaard et Bindslev-Jensen, 1992).

En ce qui concerne l'arachide, Moneret-Vautrin et *al.* (1998) a pu déterminer des doses relativement faibles lors de tests de provocation pratiqués sur 142 enfants allergiques à l'arachide. 87% des patients ont réagi à des doses cumulées inférieures à 1 g (le poids d'une graine d'arachide). Par ailleurs, les mêmes auteurs ont trouvé que la réactivité à faible dose n'est pas rare. Sur 103 patients présentant des tests positifs, 18% réagissent à 65 mg ou moins d'arachide grillée et 3,9% à 15 mg ou moins. La dose réactogène la plus faible décrite est de 5 mg (Morisset et *al.*, 2003). D'autres études trouvent également des doses réactogènes très faibles : Hourihane et *al.* (1997b) ont réalisé des test de provocation sur 14 patients adultes et

montrent que 2 mg de protéine d'arachide ingérée provoquent des symptômes objectifs et que 100 µg provoquent des symptômes subjectifs. Ces résultats sont confirmés par Wensing et *al.* (2002) : des doses réactogènes de 100 µg à 1 g sont déterminées chez 26 patients soumis à des tests de provocation. Ces mêmes patients ne présentent aucune réaction pour des doses inférieures à 30 µg. Ces travaux montrent très clairement que de faibles doses sont capables d'engendrer des symptômes cliniques chez des patients allergiques.

Comme cela a été rapporté par l'association « US peanut and Tree Nut Allergy Registry », de nombreuses réactions à l'arachide se produisent au restaurant ; elles sont dues à des aliments contenant l'arachide en tant qu'ingrédient dans la sauce, l'assaisonnement. L'identification de la graine est donc impossible par le patient. Il faut noter que les moyens d'exposition les plus courants sont les desserts (43%) suivis par les entrées (35%) et les biscuits apéritifs (13%). Les restaurants asiatiques et les confiseries sont particulièrement impliquées (Furlong et *al.*, 2001).

Il n'y a aucune donnée sur les doses réactogènes pour des patients fortement sensibilisés, qui sont évidemment exclus des tests de provocation. Il y a également une hétérogénéité dans les doses réactogènes en fonction de l'individu traité.

Ces données cliniques, épidémiologiques et expérimentales ne permettent pas de déterminer de doses, c'est-à-dire un seuil en dessous duquel une réaction adverse chez un individu sensibilisé ne se déclencherait pas.

## **4. La place de l'allergie au lait de vache**

L'existence et l'évolution de l'allergie aux protéines du lait de vache ont été très rapidement décrites, le lait étant le premier aliment donné au nourrisson. Ainsi, Hippocrate a reconnu, dès le 5<sup>e</sup> siècle avant Jésus-Christ, que le lait de vache pouvait causer des troubles digestifs et de l'urticaire. L'allergie au lait de vache se distingue de celle à l'arachide par sa fréquence importante chez l'enfant, l'acquisition de tolérance et donc sa faible fréquence chez l'adulte.

### **a) Sa fréquence**

Sa fréquence chez l'enfant est de 2,5% et diminue à 0,3% chez l'adulte (0,3%) (Sampson, 2004). Les réactions allergiques apparaissent très tôt dans la petite enfance et disparaissent généralement vers l'âge de trois à cinq ans (Moneret-Vautrin et *al.*, 1996). Cependant, cette

allergie pourrait être définitive dans 20% des cas (Kajosaari, 1982). Dans le cas d'allergie persistante au lait de vache, les enfants ont montré une hypersensibilité associée à la présence très précoce d'IgE spécifiques des protéines du lait de vache. Il existe un risque élevé pour ces enfants de développer des allergies à d'autres allergènes alimentaires (cacahuètes, œuf) ou non (chat, acarien) (Hill et al., 1994). D'autre part, une étude finlandaise récente montre qu'environ la moitié des enfants ayant souffert d'allergie au lait avant l'âge d'un an, gardent certaines séquelles comme une croissance moindre et la persistance de symptômes gastro-intestinaux suite à l'absorption de produits laitiers (Kokkonen et al., 2001).

### **b) Sa symptomatologie**

Les symptômes de l'allergie au lait de vache, décrits par différents auteurs, sont très variés, tout comme ceux de l'allergie à l'arachide. Quatre vingt neuf enfants, soumis à un test de provocation avec 100 ml de lait, présentent des symptômes de types différents: vomissements (33%, 1 heure après ingestion), diarrhées (37%), douleurs abdominales (28%), rhinite (35%), asthme (27%), dermatite atopique (35%), urticaire (11%, quelques minutes à 1 heure après ingestion), anaphylaxie (9%) (Goldman et al., 1963). Si pour Host et Halken (1990) les phénomènes cutanés, gastro-intestinaux et respiratoires sont les plus fréquents (respectivement 64%, 59% et 33%), d'autres manifestations telles que faiblesses, pâleurs et léthargie ont été également rapportées. Les symptômes sont multiples dans 77% des cas, sans règle générale d'association (Goldman et al., 1963).

Cependant, deux études permettent de distinguer deux types de réactions (Ford et al., 1983) (Baehler et al., 1996):

- Une réaction immédiate, essentiellement cutanée et oropharyngée, qui survient pour un volume ingéré faible.
- Une réaction plus tardive (entre 2 et 72 heures), qui se manifestent essentiellement par des symptômes gastro-intestinaux, pour une quantité de lait ingérée plus importante.

Dans les deux cas, des symptômes respiratoires et des vomissements peuvent apparaître. Les symptômes gastro-intestinaux sont observés essentiellement chez les enfants de moins de 1 an, et ne semblent pas liés à la présence d'IgE dans le sérum. Cependant, ceci n'exclut pas l'intervention locale d'IgE au niveau de la muqueuse intestinale : dans les fécès de patients allergiques, la présence d'IgE et de protéines dérivant des éosinophiles, témoigne d'une

inflammation locale. Par ailleurs, la présence de TNF $\alpha$  semble liée à une réaction retardée (Isolauri, 1997). Par contre, les réactions immédiates cutanées sont associées à la présence d'IgE circulantes.

Chez les enfants, l'atopie (c'est-à-dire la prédisposition génétique à développer des allergies immédiates) est très forte, avec notamment des réactions allergiques à d'autres aliments et de l'asthme.

Chez l'adulte, les symptômes associés à l'allergie au lait de vache semblent différents, et ces réactions sont reliées dans la plupart des cas à la présence d'IgE. Une étude sur 34 patients adultes démontre essentiellement une manifestation respiratoire (91,2%), cutanée (79,4%) ou au niveau gastro-intestinal (42,4%), ainsi que des troubles cardiovasculaires (34,4%). Il est à noter que dans cette étude, 91,2% des patients étaient des femmes (Stoger et Wuthrich, 1993). D'un point de vue général, Sampson (1999) souligne l'importance des réactions médiées par les IgE qui représentent 60% des réactions allergiques provoquées par le lait.

### **III. Les tests de diagnostic de l'allergie alimentaire**

La multiplicité des aliments, les réactions allergiques observées et leur caractère parfois subjectif rendent difficiles l'établissement de l'allergie et l'implication d'un allergène précis.

La démarche diagnostique comporte donc différentes étapes afin de déterminer l'origine allergique des symptômes et d'identifier le ou les allergènes en cause.

L'étape clinique comprend tout d'abord un interrogatoire et un examen clinique. Les manifestations, et notamment une anaphylaxie aiguë, consécutives à l'ingestion isolée d'un aliment sont particulièrement évocatrices. Toutefois, dans la majorité des cas, les incertitudes liées aux manifestations et à la rencontre avec l'aliment rendent nécessaires l'utilisation de tests complémentaires aux premières investigations. Il s'agit de l'étape biologique.

#### **1. Les tests *in vivo***

L'étude clinique peut ainsi être enrichie par des tests *in vivo* tels que les tests cutanés avec une batterie d'allergènes, ou les tests de provocation ouvert, en simple ou en double aveugle.

### **a) Les tests cutanés**

Plus en détail, les tests cutanés d'allergie ont pour but d'objectiver la réaction primaire d'hypersensibilité IgE-dépendante contre l'arachide au niveau de la peau du sujet sensibilisé. Ils consistent à mettre en contact les mastocytes dermiques avec les allergènes de l'arachide. Si les mastocytes sont porteurs des IgE spécifiques correspondantes, ils subissent une dégranulation provoquant la libération des différents médiateurs chimiques contenus dans les granules. Ce phénomène, très complexe mais rapide, est responsable de modifications cutanées liées à l'inflammation composant la classique triade de Lewis : œdème, érythème et prurit. En pratique, seul l'œdème est pris en considération par mesure de la papule en millimètres.

Parmi les différents tests cutanés, la technique des prick-tests est la méthode la plus fréquemment utilisée en comparaison aux cuti-réactions et à l'intra-dermo réaction (Nelson, 1983). Elle est recommandée pour sa simplicité, sa sûreté et son caractère « indolore » (Dreborg, 1993). Elle consiste à piquer l'épiderme à l'aide d'aiguilles spéciales au travers d'une goutte d'un extrait allergénique, préalablement déposée sur la peau (Demoly et *al.*, 1991). Les prick-tests sont réalisables dès les premiers jours de la vie sous réserve que la peau réagit aux témoins positifs (le phosphate de codéine provoque une dégranulation non spécifique des mastocytes). Cela permet de vérifier que la peau comporte des mastocytes aptes à réagir et que les récepteurs vasculaires H1 à l'histamine ne sont pas inhibés. Pour Meinert et *al.* (1994), le meilleur témoin positif est le chlorhydrate d'histamine car la réaction qu'il provoque n'est pas modifiée au cours de la croissance. En fait, la réactivité cutanée varie avec l'âge, le diamètre de la papule étant significativement inférieur chez le jeune enfant (Menardo et *al.*, 1985) (Skassa-Brociek et *al.*, 1987). La lecture a lieu au bout de 15 minutes (Sampson et *al.*, 1992). La réaction est positive si le diamètre de l'induration est d'au moins 3 mm et/ou supérieur de 50% à celui du témoin positif (Sporik et Hill, 1996) (Sporik et *al.*, 2000).

Ce type de test est sensible. Cependant, l'intensité des réactions cutanées obtenues n'est pas bien corrélée à la symptomatologie observée lors des tests de provocation (Hourihane et *al.*, 1997a). Par contre, il faut souligner le manque de spécificité du test. En effet, dans une étude de 1989, seulement 59% des enfants avec des prick tests positifs à l'arachide ont réagi significativement à un test de provocation (Bock et Atkins, 1989).

## **b) Les tests de provocation**

Le test de provocation apparaît dès lors comme la méthode de référence (« gold standard ») pour confirmer le diagnostic des allergies alimentaires. Il permet d'authentifier l'allergie alimentaire en reproduisant les symptômes cliniques et en précisant la dose réactogène.

### ➤ **Test de provocation par voie labiale**

Le test de provocation labial utilise les caractéristiques anatomiques des lèvres : importante vascularisation, richesse en mastocytes et faible kératinisation du versant externe (Rance et Dutau, 1997). Il s'agit d'un test de contact de l'aliment avec la muqueuse labiale dont le but est de produire des réactions locales, reflet de l'expression de la réponse IgE à l'allergène. Le test de provocation labial est intéressant chez l'enfant pour sa simplicité de réalisation et sa rapidité d'exécution et de ce fait, pour son faible coût.

Le test consiste donc à appliquer pendant une durée de dix secondes à deux minutes, selon le risque encouru, l'extrait alimentaire sur la commissure externe de la lèvre inférieure. La bouche doit rester entrouverte, à l'aide d'un morceau de coton interposé entre la gencive et la lèvre inférieure. Le patient ne doit pas parler durant l'application de l'aliment. Il peut utiliser l'extrait commercial ou l'aliment frais. Les stades de positivité sont au nombre de cinq (Rance et Dutau, 1997) :

- Stade 1 : déplissement de la lèvre inférieure
- Stade 2 : plaque d'érythème sur la lèvre
- Stade 3 : urticaire de la joue et du menton
- Stade 4 : œdème gagnant la joue, rhinite, larmolement
- Stade 5 : réaction systémique, prurit sur la zone d'eczéma, toux, asthme.

Outre sa simplicité, la technique du test de provocation labial est séduisante en pédiatrie pour sa sécurité. En effet, il est réalisable même si l'allergie alimentaire s'est traduite initialement par une anaphylaxie aiguë. De ce fait, il peut précéder un test de provocation par voie orale et l'éviter en cas de positivité. Par contre, sa sensibilité est relativement faible, de l'ordre de 77% (Rance et Dutau, 1997), ce qui conduit à réaliser un test de provocation par voie orale si le test de provocation labial est négatif ou même de stade inférieur ou égal à 3 (Rance et Dutau, 1997).

### ➤ **Test de provocation par voie orale**

La place du test de provocation par voie orale est capitale en allergologie alimentaire. Il reproduit l'histoire clinique en respectant le temps, la quantité des aliments (ou doses cumulées réactogènes) et les symptômes. Ces informations évaluent le risque encouru lors de la consommation accidentelle de l'aliment et fournissent des renseignements sur les mesures à prendre (degré d'éviction et composition de la trousse d'urgence). Le test de provocation pourrait aussi permettre d'apprécier la guérison éventuelle de l'allergie à l'arachide (Sicherer, 1999).

Les tests de provocation peuvent être réalisés en « ouvert » (l'équipe soignante et le patient connaissent le contenu de la mixture ingérée) ou en « aveugle » (le contenu de la mixture ingérée est connu par l'équipe médicale seule : simple aveugle ou par aucun des intervenants : double aveugle).

L'aliment, utilisé principalement sous forme lyophilisée, peut être dissimulé dans un aliment non représentatif comme une compote de pomme cuite ou une purée de pomme de terre. Les doses sont progressivement croissantes, toutes les 20 minutes en l'absence de symptôme. Le placebo est donné avec la même progression. Les délais d'apparition des symptômes sont le plus souvent de quelques minutes et peuvent aller jusqu'à 4 heures après l'absorption de l'aliment. Seuls sont pris en considération les signes objectifs concernant les organes suivants : peau (érythème, prurit, réactivation précoce d'une dermatite atopique, urticaire, œdème), nez (éternuement, obstruction, écoulement), poumon (toux sèche, dyspnée, chute du DEP ou du VEMS de 20%), appareil digestif (diarrhée, nausée, vomissement), appareil cardio-vasculaire (chute de la pression sanguine de 2 points, tachycardie supérieure de 20% aux normes).

Une réaction allergique survenant au cours du test de provocation impose l'arrêt de l'ingestion des doses et l'administration d'un traitement adapté aux symptômes. La dose réactogène moyenne est variable. La première étude conduite par Bock et *al.* (1978) chez 14 enfants dont l'allergie à l'arachide est établie par des tests de provocation par voie orale en double aveugle, enregistre des doses réactogènes entre 100 mg et 8 grammes d'arachide.

Il est incontournable de dire que les tests de provocation sont les tests les plus représentatifs des manifestations cliniques observés lors de l'ingestion de l'aliment incriminé. Ils permettent

de confirmer la nécessité d'éviction de l'aliment en question et des aliments pouvant le contenir.

Le test de provocation par voie orale est potentiellement dangereux. Il est donc impérativement réalisé au sein d'une structure capable de traiter rapidement une anaphylaxie, sous la surveillance spécialisée du personnel médical. Il est évidemment contre-indiqué pour des raisons éthiques, si l'allergie alimentaire s'est révélée par une anaphylaxie aigue. A titre d'exemple, les tests de provocation en double aveugle sont récusés pour cette raison dans 48% des cas d'allergie à l'arachide, 8% des allergies à l'œuf et 6% des allergies au lait de vache (Dutau et *al.*, 2005). Par ailleurs, cette méthode, qui nécessite l'hospitalisation de la personne, est lourde et contraignante. L'utilisation des tests de provocation se trouve ainsi restreinte à des cas bien définis et selon des conditions strictes (Bindslev-Jensen et *al.*, 2004).

Enfin, le test comporte de nombreux biais. Les réactions observées lors d'épisodes allergiques ne sont pas forcément reproduites durant le test de provocation (Warner, 1999). Compte tenu du risque important, le test est immédiatement interrompu à la moindre manifestation et seules les premières réactions peuvent être observées. La part émotionnelle peut également influencer le déroulement du test et des observations dites « subjectives » (douleurs exprimées par le patient) sont fréquemment notées durant le test (Wensing et *al.*, 2002).

## **2. Les tests in vitro : le dosage des IgE spécifiques**

L'étude clinique peut être confortée par des tests *in vitro* qui tentent de traduire objectivement, par la mesure d'un paramètre sur un échantillon biologique humain, l'état allergique du patient. Ces tests biologiques, sans risque pour le patient, permettent d'incriminer un allergène particulier au sein d'un aliment. Différents tests biologiques sont utilisés :

- le dosage des IgE spécifiques, isolément ou par groupes, d'un aliment ou d'une protéine donnés.
- les immuno-empreintes : elles permettent d'établir la reconnaissance par les IgE spécifiques de protéines séparées sur un gel de polyacrylamide.

- les tests par inhibition : ils permettent de comparer le pouvoir allergénique de deux allergènes différents, mais également, d'établir les réactions croisées entre des allergènes de structure proche.
- les tests d'histamino-libération et de dégranulation des basophiles : ils permettent d'évaluer le potentiel déclenchant de l'allergène et mettent ainsi en évidence la libération de médiateurs, notamment l'histamine, au contact des allergènes.

Les tests « in vitro » apportent donc une aide précieuse pour confirmer le diagnostic de l'allergie alimentaire. C'est un outil important pour le suivi des sensibilisations et des allergies alimentaires. La dénomination RAST est consacrée par l'usage routinier pour désigner un dosage d'IgE sérique quelle que soit la technique, par référence à la première technique développée, le Phadebas RadioAllergoSorbent Test (RAST).

L'allergène, fixé à un support solide, est incubé avec le sérum à tester et la fixation des IgE spécifiques de l'allergène présent est révélée par un anticorps anti-IgE marqué. Le marqueur radio-isotopique, initialement utilisé, est actuellement remplacé par des marqueurs fluorescents ou enzymatiques.

Les taux d'IgE mesurés sont exprimés en  $\text{kU}\cdot\text{ml}^{-1}$  ou  $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  selon le produit commercial utilisé. La technique de dosage des IgE sériques spécifiques, reconnue comme la référence, est celle du Cap System<sup>®</sup> de Pharmacia. Les résultats sont exprimés en  $\text{kU}_A\cdot\text{ml}^{-1}$  : le seuil de détection est fixée à  $0,35 \text{ kU}_A\cdot\text{ml}^{-1}$  (ancienne classe 0).

Les résultats sont influencés par un taux élevé d'IgG spécifiques, par la qualité des réactifs, par les possibilités d'allergénicité croisée, et surtout par les fortes valeurs d'IgE sériques totales (5 à  $20000 \text{ kU}_A\cdot\text{ml}^{-1}$ ) à l'origine de faux positifs (Bernstein et Storms, 1995). La sensibilité du dosage des IgE spécifiques est variable selon les études (Pastorello et *al.*, 1995) (Yunginger et *al.*, 2000) (Sampson, 2001). En 1997, Sampson et Ho ont établi des valeurs seuils d'IgE spécifiques dirigées contre des aliments usuels, au-dessus desquelles les tests de provocation par voie orale ont 95% de chance d'être positifs. Ceci pourrait permettre de réduire les prescriptions de ces tests. Les avantages et conditions de ces tests seront discutés plus en détail dans le chapitre 1.

## **IV. Caractéristiques des allergènes alimentaires**

En dépit de l'immense diversité de l'alimentation humaine, relativement peu d'aliments sont responsables de la majorité des allergies alimentaires. A travers une description des caractéristiques générales des allergènes alimentaires, nous détaillerons les données actuelles permettant de décrire un allergène et sa reconnaissance par les IgE spécifiques. Puis, après présentation de la classification des protéines végétales, nous verrons la place des allergènes actuellement décrits pour l'arachide dans cette classification. Enfin, rapidement, nous décrirons les principaux allergènes du lait de vache, protéines d'origine animale.

### **1. Caractéristiques générales**

#### ***a) Définitions et nomenclature***

Les allergènes sont des antigènes reconnus par les IgE et capables d'induire une réponse immunitaire dite « allergique » liée à la synthèse d'IgE spécifiques. Les allergènes alimentaires sont appelés trophallergènes par opposition aux allergènes respiratoires, les pneumallergènes. Les trophallergènes représentent un groupe important des allergènes et sont divisés en deux groupes selon Aalberse (1997):

- Capacité à seulement induire des symptômes cliniques chez des individus sensibilisés (allergènes incomplets)
- Capacité à sensibiliser et induire des réactions chez des individus prédisposés (allergènes alimentaires complets).

Un allergène est dit majeur s'il fait réagir 50% des sujets à cet élément, c'est-à-dire s'il est reconnu par les IgE spécifiques d'au moins 50% des patients testés et s'il donne des tests cutanés immédiatement positifs, à une concentration très faible, chez au moins 90% des sujets. Un allergène est dit mineur s'il n'intéresse environ que 10% des sujets. L'allergène intermédiaire se situe entre ces deux chiffres.

Un isoallergène désigne un allergène de masse moléculaire et de fonction biologique identiques à un autre allergène ayant une homologie de séquence d'acides aminés d'au moins 67%. Ils se différencient par leur point isoélectrique. En effet, la modification de groupements carboxyles ou amino-terminaux transforme ainsi la charge électrique donc le point isoélectrique. Ces isoallergènes sont associés en groupe car toujours reconnus ensemble.

La dénomination de nouveaux allergènes est codifiée par la nomenclature WHO/IUIS, publiée pour la première fois en 1986 (Marsh *et al.*, 1986) et remise à jour en 1994 (Hoffman D. *et al.*, 1994). Ces dernières années, les avancées dans la caractérisation et la détermination de séquence d'allergènes ont été rapides, grâce aux approches de la biologie moléculaire. En accord avec la taxonomie, les allergènes sont désignés comme il suit : les trois premières lettres du genre, un espace, la première lettre de l'espèce, un espace et un chiffre arabe. Les chiffres sont donnés par ordre d'identification. Ainsi le premier allergène de l'arachide (*Arachis Hypogaea*) est Ara h 1. Il peut y avoir des précisions, données lors de l'appellation, pour indiquer le genre ou l'espèce exacte.

### **b) Structure**

Les trophallergènes sont classiquement décrits comme des glycoprotéines de masse moléculaire variant entre 10 et 60 kDa (Burks *et al.*, 2001) et de points isoélectriques acides. Il n'est pas connu de caractéristiques biochimiques ou immunochimiques uniques propres aux allergènes alimentaires. Cependant quelques caractéristiques biochimiques distinctes peuvent être associées aux protéines reconnues comme étant allergéniques, à savoir que les allergènes alimentaires peuvent être solubles dans l'eau (albumines) ou dans les solutions salines (globulines).

En dehors de la masse moléculaire suffisante pour assurer une bonne immunogénéicité et une absorption muqueuse, l'allergénicité d'une protéine dépend également du nombre et des propriétés des épitopes. Les épitopes sont les portions de la molécule protéique (antigénique) qui se lient à l'anticorps spécifique et qui sont donc responsables de l'immunoréactivité. On distingue les épitopes séquentiels ou linéaires dépendant de l'enchaînement des acides aminés (structure primaire), des épitopes conformationnels dépendant de la structure tertiaire ou quaternaire de l'allergène. Ces épitopes conformationnels sont continus s'ils correspondent à un enchaînement d'acides aminés, ou discontinus s'il s'agit d'un rapprochement spatial de séquences non contiguës. Il est à souligner l'importance des épitopes linéaires dans les phénomènes d'allergie alimentaire puisque le système immunitaire peut les rencontrer même après dénaturation partielle et digestion dans le tractus gastro-intestinal. Les travaux de Vila *et al.* (2001) illustrent l'importance des épitopes linéaires dans l'allergie alimentaire persistante et dans la valeur prédictive potentielle des épitopes conformationnels.

Bien que la stabilité des allergènes soit démontrée pour un large éventail d'allergies alimentaires, leur capacité de résistance à la dégradation est peu expliquée. La présence de ponts disulfures dans la plupart des allergènes alimentaires laisse supposer que la structure de la protéine est un facteur important dans la capacité de l'allergène à résister à la dénaturation, notamment lors de la digestion gastro-intestinale (Lehrer *et al.*, 1996). De plus, la structure quaternaire des protéines résultant notamment d'un phénomène d'agrégation protéine/protéine, peut jouer un rôle important pour les propriétés allergéniques de ces protéines.

### **c) Réactions croisées**

La réactivité croisée allergénique reflète les relations phylogénétiques entre les organismes. Une relation phylogénétique résulte du fort degré d'homologie dans la structure primaire des protéines : leur séquence en acides aminés. Cette forte homologie dans la séquence primaire peut conduire à des structures tridimensionnelles homologues.

Les réactions croisées entre allergènes inhalés et allergènes ingérés ont été initialement décrites à propos des associations d'allergies polliniques et alimentaires à certains fruits et légumes. Néanmoins, d'autres allergies peuvent être également impliquées agissant à la fois par inhalation et par ingestion. Les allergènes responsables sont soit des substances volatiles, soit des substances pulvérulentes et les sensibilisations respiratoires ont été surtout observées en milieu professionnel en raison de contacts massifs et homogènes.

Les nombreuses observations d'allergies croisées entre pneumallergènes de l'environnement et allergènes alimentaires peuvent être dues à trois mécanismes principaux :

- Identité complète entre l'allergène inhalé et l'allergène alimentaire
- Identité allergénique, la protéine en cause étant présente mais dissimulée dans l'aliment
- Epitopes communs partagés par des aliments et des particules inhalées provenant cependant de sources non liées.

Les allergènes incriminables entraînent de nombreuses réactions croisées entre des fruits et des légumes phylogénétiquement éloignés, ainsi qu'entre certains pollens et le latex.

La réaction croisée *in vitro* est la condition nécessaire mais non suffisante d'une réaction allergique croisée. *In vivo*, celle-ci impose des contraintes comme la nécessité de pontage des IgE cellulaires, à la surface des cellules effectrices, par l'allergène. L'affinité des anticorps est un autre facteur conditionnant le pontage, dont il faut tenir compte pour une relevance

clinique. Il est donc important de différencier les réactions croisées sur le plan clinique et les réactions croisées sur le plan immunologique. Des similitudes de structure entre arachide, soja et pois peuvent provoquer de nombreuses réactions cutanées faussement positives chez des sujets allergiques à l'arachide. De même, des sujets allergiques aux graminées peuvent présenter des IgE spécifiques positives contre le blé, sans jamais présenter de manifestations après consommation de pain. La réactivité croisée entre les légumineuses est faible : de 2,9% à 6% des patients (Bernhisel-Broadbent et Sampson, 1989) (Barnett *et al.*, 1987) (Lalles et Peltre, 1996).

## **2. Les familles des protéines végétales et la place des allergènes de l'arachide**

### **a) Classification**

Les allergènes alimentaires sont classés actuellement selon la classification biochimique des protéines, en y ajoutant les allergènes de fonctions biologiques connues. Les allergènes végétaux ont été particulièrement étudiés depuis ces dernières années. Ils sont retrouvés dans de nombreuses familles de protéines : les protéines de structure et métaboliques, les protéines liées aux agressions pathogènes (PR-protéines) et les protéines de réserve.

Un groupe de travail européen a mis en place une base de données appelée PROTALL (adresse électronique : <http://www.ifr.ac.uk/PROTALL/cover.html>) sur les allergènes des plantes (Mills E.N.C. et Shewry P.R., 2004).

Les protéines de réserve représentent une large partie des allergènes des plantes, ce qui est notamment le cas pour l'arachide. Ces allergènes alimentaires, qui transitent via le tractus gastro-intestinal, appartiennent majoritairement à deux superfamilles protéiques (Mills *et al.*, 2004).

La superfamille des prolamines regroupent six familles de protéines : les prolamines de céréales (riz, blé, orge, millet), les inhibiteurs tryptiques et d' $\alpha$ -amylases, les albumines 2S, les protéines de transfert de lipides (nsLTP) et les puroindolines de céréales. Elles ont toutes en commun un canevas conservé de cystéines ainsi que sa localisation, et une structure tridimensionnelle contenant 3 à 4 hélices  $\alpha$ .

La superfamille des cupines est décrite par une structure en double couche de feuillets (Murzin et *al.*, 1995). Les allergènes les plus étudiés de cette superfamille sont les globulines 7S (vicilines) ou les globulines 11S (glycinines).

A côté de ces deux superfamilles, se classe la famille des protéases à cystéine C1, caractérisée par leur site catalytique (cystéines). La famille C1 est identifiée par un site actif conservé avec des résidus Gln, Cys, His et Asn et comprend beaucoup de peptidases à activités exo- et endo-peptidases (Rawlings et Barrett, 1995).

### ***b) La famille des globulines***

#### ***(i) Structure générale***

Les protéines de réserve des plantes, solubles en solution saline, appelées globulines, font partie des premières protéines à avoir été étudiées et ont été décrites en détail par Osborne (1924). Ces protéines sont séparées selon leur coefficient de sédimentation. Une large fraction est caractérisée par une sédimentation lente, de coefficient 11S et 12S. Une autre plus petite fraction présente un coefficient de sédimentation de 7S et 8S. Les globulines sont riches en lysine et en arginine mais plus pauvres en tryptophane et en acides aminés amidés (asparagine et glutamine). Elles sont présentes dans les dycotylédones (plantes angiospermes à un seul cotylédon) et les monocotylédones (plantes angiospermes à 2 cotylédons).

Les globulines 11S et 12S sont des protéines multimériques de masses moléculaires de 300 à 450 kDa. En général, elles existent en tant que trimères et hexamères comprenant des sous-unités de 50 à 60 kDa liées par des interactions non covalentes. Les sous-unités sont le produit d'une famille multigénique, la première décrite étant celle du soja, où 5 gènes ont été identifiés (Nielsen et *al.*, 1989). Les auteurs ont synthétisé des polypeptides, qui sont ensuite clivés post-traductionnellement pour donner une chaîne polypeptidique acide de 30 à 40 kDa et une chaîne basique de 20 kDa liées entre elles par un pont disulfure intermoléculaire simple.

Les globulines 7S/8S sont souvent appelées vicilines car elles sont abondamment présentes dans le groupe de légumineuses Viciae. Elles se présentent sous forme de protéine trimérique de masse moléculaire de 150 à 190 kDa avec des sous-unités de masse moléculaire comprise

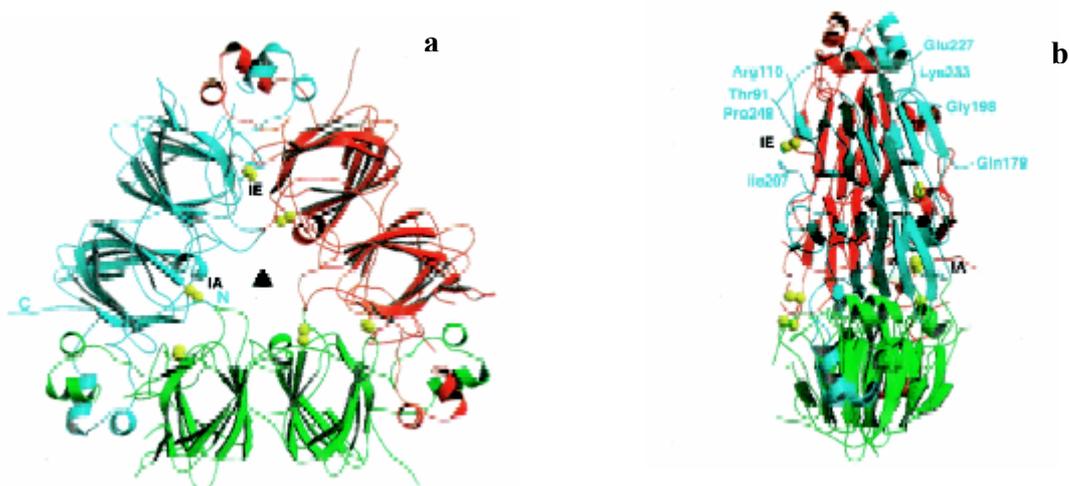
entre 40 à 80 kDa, mais typiquement de 50 kDa. De plus, elles sont soumises à un processus protéolytique et de glycosylation. Les vicilines ne contiennent pas de ponts disulfures dans leur structure, leur profil SDS PAGE n'est donc pas modifié par un traitement réducteur préalable.

Les globulines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) avant d'être transportées vers une vacuole où elles sont stockées pour former des corps protéiques. Dans certaines céréales, les globulines sont stockées dans la graine sous forme d'une matrice protéique.

### (ii) Structure tridimensionnelle

La comparaison des séquences des globulines montre un degré d'homologie limité, seulement de 35 à 45%, malgré leur haut degré de similarité structurale.

Les structures tridimensionnelles ont été déterminées pour le précurseur de la globuline 11S du soja, la proglycinine (Adachi et *al.*, 2001) (figure 4), et pour les globulines 7S du haricot en grain, la canavaline (Ko et *al.*, 1993), du haricot vert, la phaseoline (Lawrence et *al.*, 1994) (figure 5) et du soja, la sous-unité  $\beta$  de la  $\beta$ -conglycine (Maruyama et *al.*, 2001).



**Figure 4 :** structure tridimensionnelle du trimère de la proglycinine du soja (Adachi et al., 2001). Trois protomères sont représentés en rouge, cyan et vert. Les ponts disulfures sont représentés par des sphères jaunes avec un angle de 1.2 Å. IA et IE indiquent les ponts disulfures entre les cystéines 12 et 45 et entre les cystéines 88 et 298. N et C indiquent les terminaisons N et C de la séquence. (a) axe de symétrie 3D perpendiculaire au papier, représenté par un triangle. (b) vue après une symétrie de 90° autour de l'axe de symétrie verticale.

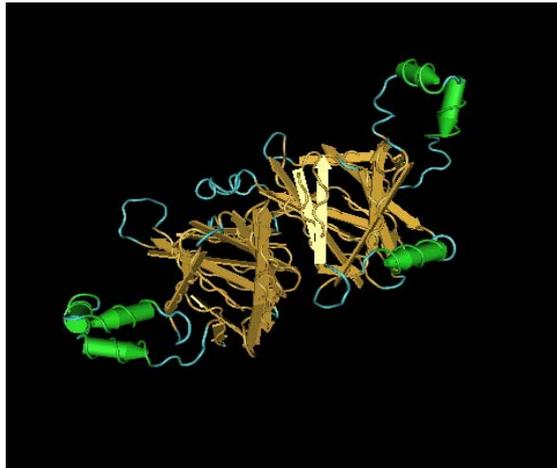


Figure 5 : structure tridimensionnelle de la phaseoline (Lawrence et *al.*, 1994).

Chaque domaine comprend un tonneau  $\beta$  composé de plusieurs feuillets anti-parallèles suivi par un certain nombre d'hélices, structure illustrée en figures 4 et 5 respectivement par le précurseur de la globuline 11S du soja, la proglycinine et la globuline 7S du haricot, la phaseoline. A l'intérieur de cette structure, environ 30 acides aminés sont conservés ou échangés de manière conservative pour les globulines 7S et 11S. Une majorité de ces résidus conservés est impliquée dans des blocs inter-monomères ou dans des boucles inter-chaînes, où ils sont soumis à des contraintes structurales. Cette similarité structurale entre les globulines 11S et 7S a été identifiée en 1985 et amène à penser qu'elles descendent d'un ancêtre commun (Argos et *al.*, 1985).

La structure tridimensionnelle de l'allergène Ara h 1, la globuline 7S de l'arachide, a été établie par similitude avec la phaseoline.

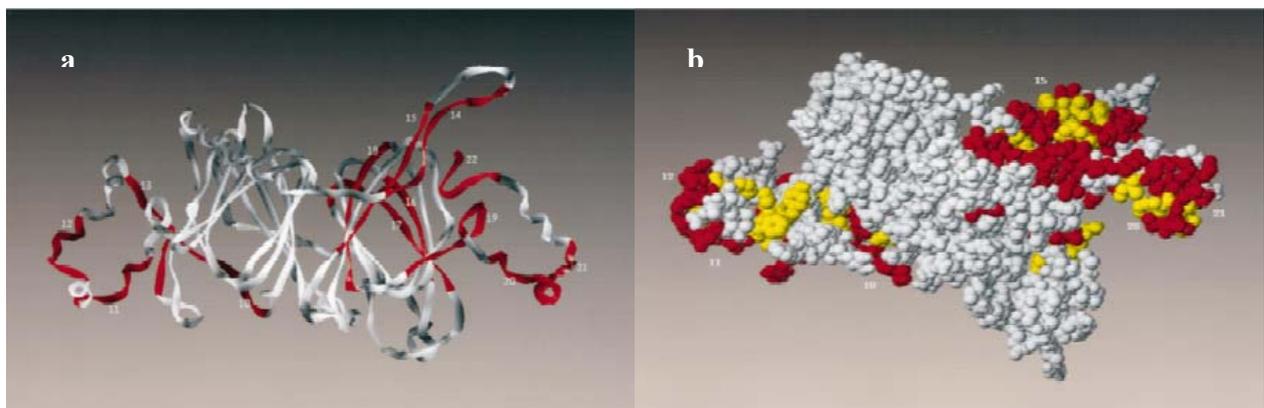
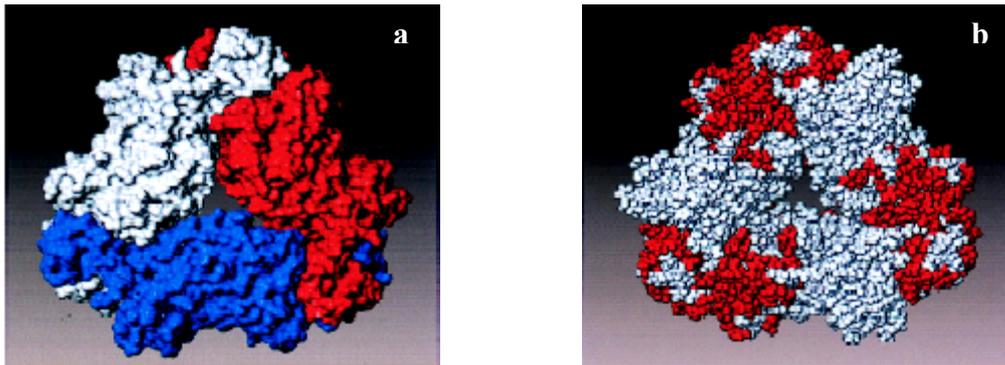


Figure 6 : Structure tridimensionnelle d'Ara h 1 établie par homologie avec la phaseoline (Shin et *al.*, 1998). La majorité des épitopes d'Ara h 1 est localisée dans deux régions de l'allergène. (a) : diagramme ruban de la structure tridimensionnelle d'Ara h 1. Les aires en rouge sont les épitopes 10-22. Les épitopes 13 et une partie de 14 et 15 se trouvent dans une aire structurale incertaine. (b) structure tertiaire d'Ara h 1. Les aires en rouge représentent les épitopes et les atomes en jaune sont les résidus critiques dans la liaison des IgE.

Il a été possible à Shin *et al.* (1998) d'établir le positionnement des épitopes sur la structure tridimensionnelle de l'allergène. Deux régions de l'allergène contiennent la majorité des épitopes. Certains acides aminés sont critiques pour la liaison des IgE. De plus, il a été également établi qu'Ara h 1 forme des trimères très stables par établissement de liaison intermoléculaires (figure 7) et les épitopes d'Ara h 1 reconnus par les IgE de patients allergiques sont regroupés dans les régions de contact des monomères (Maleki *et al.*, 2000).



**Figure 7 : structure tridimensionnelle de l'homotrimère d'Ara h 1, formée notamment lors du grillage de l'arachide (Maleki *et al.*, 2000). (a) les trois monomères sont représentés par des couleurs différentes. (b) les épitopes immunodominants sont présents dans les zones de contact des monomères (en rouge) pour former le trimère.**

### *(iii) Les modifications post-traductionnelles : les glycosylations*

Les globulines 11S sont rarement glycosylées, à l'exception de la sous-unité acide de la globuline du lupin de masse moléculaire 44 kDa. Une sérine dans la région conservée de la sous-unité acide de cette protéine présente la séquence consensus N-glycosylée, c'est-à-dire N-X-S, qui est absente des polypeptides acides des autres globulines 11S. Cette mutation ponctuelle conduit à la glycosylation avec environ 1% (p/p) de carbohydrates, ce qui affecte le repliement subséquent, l'assemblage et le processus de protéolyse.

Par contre, les globulines 7S sont fréquemment glycosylées avec un à deux sites de N-glycosylations localisées dans le domaine C-terminal de la protéine. La globuline 7S de l'arachide présente un mélange hétérogène de N-glycanes comprenant  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}$  et  $\text{Man}_{3-4}\text{XylGlcNAc}$ .

***(iv) L'allergénicité des globulines***

Bien que les globulines de l'arachide et du soja soient les mieux caractérisées comme allergènes alimentaires, d'autres membres de cette famille sont également impliqués comme allergènes alimentaires. Cela inclut notamment les globulines 7S de la noix (Jug r 2), une des sous-unités de la globuline 7S protéolysées des lentilles, les globulines 7S du sésame et de la noix de cajou ainsi que les globulines 11S de la noix de coco, de la noix et des amandes.

**c) La famille des albumines 2S**

***(i) Structure générale***

Le terme albumine est depuis 1924 limité aux protéines qui sont solubles dans l'eau et coagulent sous l'effet de la chaleur (Osborne, 1924). Par la suite, les études de coefficients de sédimentation ont permis de distinguer des composés 2S, 11S et plus rarement 7S. Les albumines 2S sont donc solubles dans l'eau et représentent entre 20 et 60% des protéines de réserve. L'analyse des acides aminés révèle que les albumines 2S sont riches en cystéine, jusqu'à 13,1% (en molarité) pour l'albumine de la noix du Brésil qui contient également 17,3% de méthionine. Bateman *et al.* (2002) ont listé des albumines 2S de 18 genres de dicotylédones et de trois genres de gymnospermes. Par contre, il n'a jamais été confirmé par des analyses biochimiques ou par voie de la biologie moléculaire, que les albumines 2S étaient présentes dans les monocotylédones.

***(ii) Synthèse et maturation des albumines 2S***

Les albumines 2S, protéines de réserve synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux, sont transportées dans la lumière du RE par clivage de la séquence signal amino-terminale. Le repliement de la protéine se produit donc à l'intérieur du RE, avec les huit cystéines conservées et présentes dans toutes les albumines 2S formant ainsi un profil identique de quatre ponts disulfures intra-chaînes. Les protéines sont transportées par l'appareil de Golgi vers des vacuoles où elles s'accumulent pour former des corps protéiques. Les glycosylations ne sont pas décrites mais un processus de protéolyse se produit à l'intérieur des vacuoles. Dans la plupart des albumines 2S, cette protéolyse génère une

structure en deux sous-unités (hétérodimère), avec une petite sous-unité contenant les cystéines 1 et 2 et une grande sous-unité contenant les cystéines 3 à 8. Ces deux sous-unités restent associés par deux des ponts disulfures formés dans le RE. L'albumine 2S hétérodimérique typique est la napine du colza (*Brassica napus*). La protéolyse se produit généralement du côté carboxy-terminal des asparagines et conduit à la perte d'un ou plusieurs peptides courts : une proséquence amino-terminale, un peptide carboxy-terminal et un peptide liant les deux sous-unités.

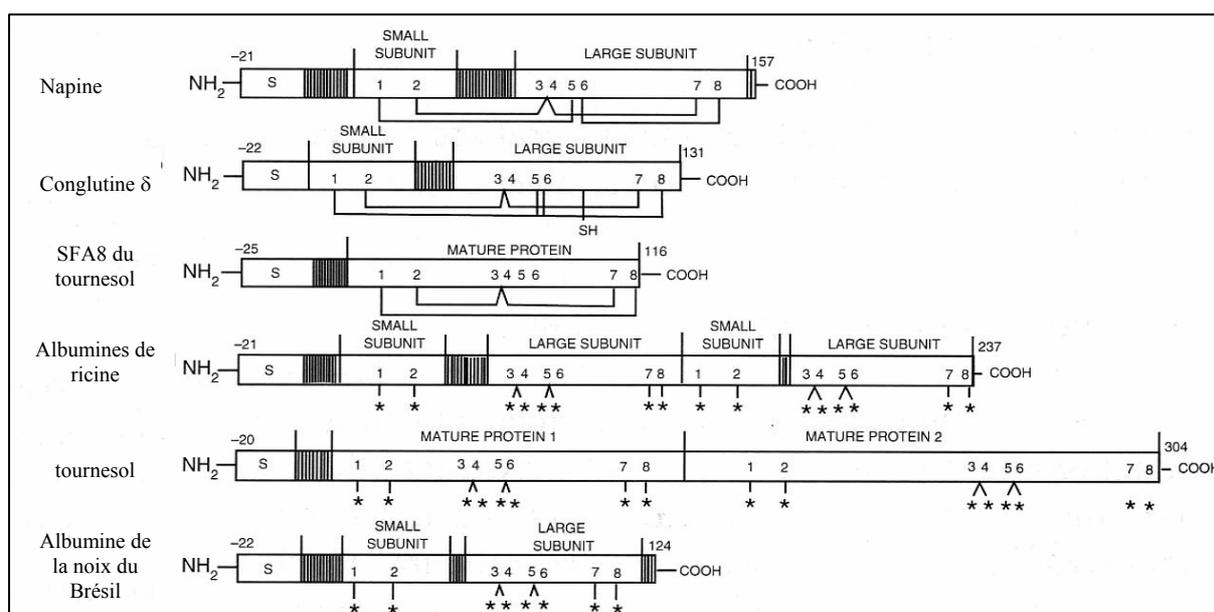


Figure 8 : structures schématiques des différentes albumines 2S (Mills et Shewry, 2004).

Les peptides signal sont indiqués par la lettre S. Les aires hachurées représentent les séquences enlevées après le clivage de la protéine mature. Les cystéines conservées sont numérotées de 1 à 8, les ponts disulfures étant représentés pour les 3 premières albumines. La napine et la conglutine  $\delta$  sont synthétisée comme des protéines précurseurs qui sont clivées pour donner des protéines mature hétérodimérique, mais la conglutine  $\delta$  présente une cystéine supplémentaire non liée (SH). Les albumines de tournesol présentent une cha ne simple et sont synthétisées avec seulement le SFA8 ou avec les deux albumines par un simple ARN messager. Les albumines de la ricine sont également synthétisées par paire par un ARN messager unique mais sont clivées pour donner deux protéines hétérodimériques matures.

Quoiqu'il en soit, des variants des albumines 2S existent. En particulier, les albumines de tournesol (*Helianthus annuus*, Compositae) ne sont pas clivées en deux sous-unités bien qu'une proséquence N-terminale soit enlevée. En outre, dans le tournesol et le ricin (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae), les albumines sont synthétisées sous forme de protéine précurseur et subissent ensuite une protéolyse, probablement dans les vacuoles, pour donner deux chaînes simples d'albumines pour le tournesol ou deux albumines hétérodimériques pour le ricin. L'albumine 2S du lupin contient de façon inhabituelle 9 cystéines. Ce résidu cystéine

est présent en position 45 dans la grande sous-unité et est facilement bloquée par un amino-éthylmaléimide. Ainsi un groupement sulphydryl est libre. De même, une albumine 2S de l'arachide, l'allergène Ara h 6, contient 10 cystéines (Kleber-Janke et *al.*, 1999), une supplémentaire en position 84 et l'autre en position carboxy-terminale, ce qui offre la possibilité d'un pont disulfure supplémentaire.

### ***(iii) Polymorphisme des albumines 2S***

Les albumines 2S n'existent pas comme protéines simples mais comme des protéines polymorphes apparentées structurellement et codées par des petites familles de gènes. Cela a été étudié en détail pour les napines par différentes équipes qui ont décrit de 4 à 16 gènes mais également pour les noix du Brésil et le tournesol où respectivement six et environ 11 à 13 composés sont séparés par électrophorèse et chromatographie en phase inverse (Mills et Shewry, 2004).

### ***(iv) Composition et séquence en acides aminés***

Les albumines 2S sont riches en glutamine et arginine, acides aminés qui contiennent deux ou trois atomes d'azote, respectivement. Une caractéristique de plus grand intérêt est leur teneur en acides aminés soufrés, la cystéine et la méthionine.

En effet, nous avons vu précédemment que toutes les albumines 2S contiennent huit cystéines. Ainsi, les albumines de la noix du Brésil, contenant environ 30% de protéines extraites avec des solutions salines ou du SDS, sont constituées environ de 19% et de 8% (en molarité) de méthionine et cystéine. Elles se présentent au moins six formes différentes, avec de grandes sous-unités contenant 14 ou 15 méthionines.

Les albumines les plus décrites en terme de séquences sont les napines de *B. napus* et celles apparentées aux protéines de type napine de la famille des Brassicaceae. L'alignement des séquences des albumines pour huit espèces des Brassicaceae et d'une séquence d'*Arabidopsis* montre des similarités de 85% à 95%.

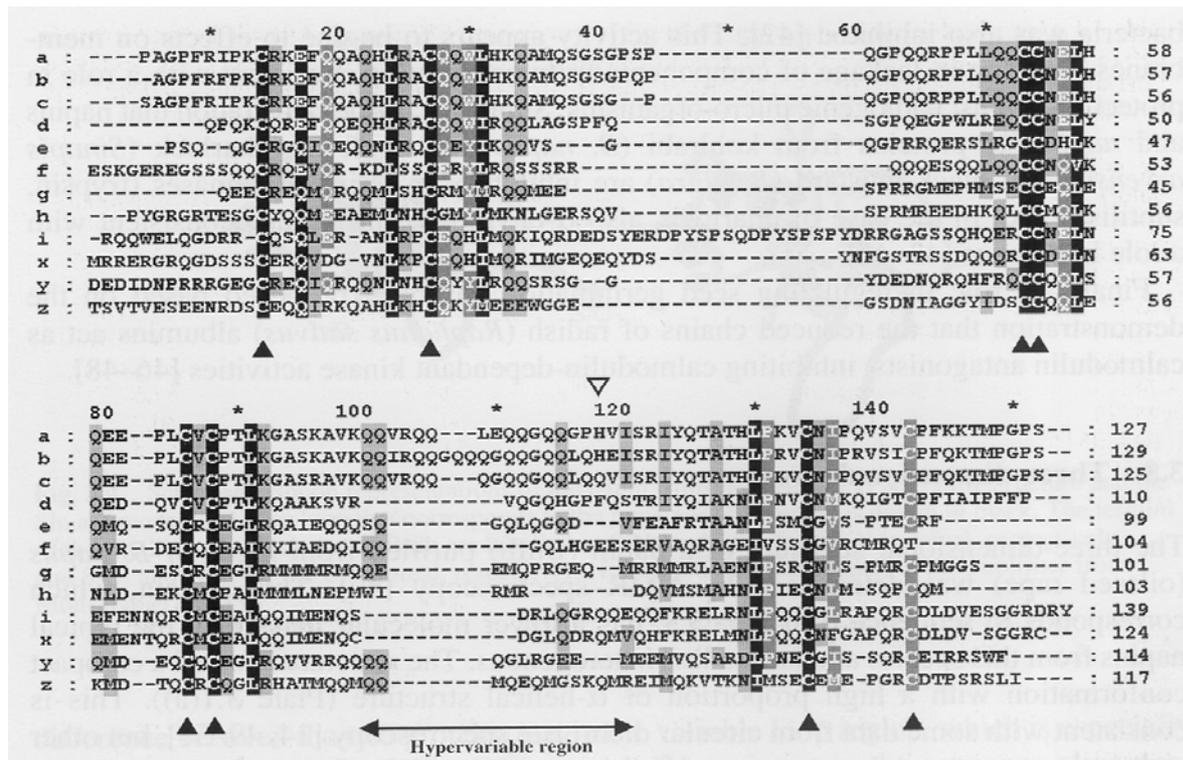


Figure 9 : alignement des séquences d'albumines 2 S (Mills et Shewry, 2004). (a) *Sinapis alba* Sin a 1 ; (b) *Brassica juncea* Bra j 1 ; (c) *Brassica napus* Bra n 1 ; (d) *B. napus* BnIb ; (e) *Ricinus communis* Ric c 1 ; (f) *R. communis* Ric c 3 ; (g) *Bertholletia excelsa* ber e 1 ; (h) *Helianthus annuus* SFA8 ; (i) *Arachis hypogaea* Ara h 2 ; (x) *A. hypogaea* Ara h 6 ; (y) *Juglans regia* Jug r 1 ; (z) *Gossypium hirsutum* Mat5-DC. Les triangles noirs indiquent le profil consensus de cystéines. A droite des séquences, les numéros des acides aminés. Le programme clustalW a été utilisé avec des traits représentant les trous introduits pour les meilleurs alignements. Les résidus conservés sont surlignés en noir pour les domaines de hautes conservations.

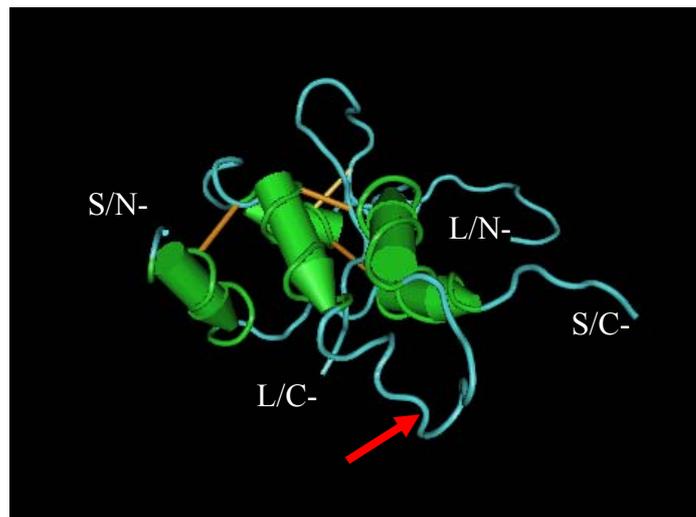
Un alignement de séquence d'albumines 2S, réalisé par Mills et Shewry (2004), est présenté en figure 9.

Ces protéines partagent le profil conservé des huit cystéines (-C-C-CC-CXC-C-C-), caractéristique des membres de la superfamille des prolamines, formant un profil très similaire de ponts disulfures inter et intra-chaînes. Quoiqu'il en soit, les structures primaires peuvent montrer des faibles taux d'identité, en-dessous de 15% dans certains cas. Ceci résulte de la divergence dans les séquences nucléotidiques combinée à un processus différentiel des précurseurs protéiques entre les espèces.

Une autre propriété générale des albumines 2S est la présence d'une région hypervariable dans la chaîne longue (ou dans la région correspondante de la chaîne simple des albumines). Des études structurales indiquent que la séquence de cette région forme une boucle variable et constitue une région antigénique importante.

(v) *Structure tridimensionnelle*

La structure tridimensionnelle de la napine (BnIb) (figure 10) a été déterminée par spectrométrie RMN (Rico *et al.*, 1996). La structure montre une conformation compacte avec une forte proportion d'hélices. Ces données sont compatibles avec celles obtenues par dichroïsme circulaire. On observe cinq hélices arrangées en superhélices de tour droit. La région hypervariable, de longueur différente, observée dans les séquences des albumines 2S se trouve entre deux hélices.



**Figure 10 :** structure tridimensionnelle de la napine (BnIb), albumine 2S du colza (Rico *et al.*, 1996). La boucle qui correspond à la région hypervariable est indiquée par la flèche rouge. Les terminaisons pour des chaînes petites et longues sont respectivement nommées S/N- et L/N- en N-terminal et S/C- et L/C- en C-terminal.

(vi) *L'allergénicité des albumines 2S*

Les albumines 2S constituent un groupe majeur d'allergène des plantes. Des allergènes de cette famille sont décrits dans le soja, les pois, le ricin, l'arachide, la noix, le tournesol, la moutarde et le colza.

Les albumines 2S allergéniques les plus décrites sont Sin a 1 et Bra j 1, respectivement allergènes majeurs de la moutarde jaune (*Sinapis alba*) et de la moutarde orientale (*Brassica juncea*).

Tous les résultats concernant les allergènes de la moutarde sont répertoriés dans la revue de Mills et Shewry (2004). La moutarde provoque des réactions atopiques très sévères, menant parfois à des chocs anaphylactiques. Les allergènes responsables de ces réactions ont été isolés et caractérisés. Dans le cas de Sin a 1, les épitopes reconnus par les cellules B ont été

établi en testant l'immunoréactivité de dix anticorps monoclonaux. Deux régions immunodominantes ont été trouvées dont une se situant très près de la région hypervariable des albumines 2S.

En 1997, Ara h 2, une albumine 2S, est caractérisé comme allergène majeur de l'arachide, la présence d'IgE spécifique se vérifiant pour plus de 90% des patients allergiques à l'arachide, et ses épitopes sont identifiés (Stanley et *al.*, 1997). Plus récemment, d'autres albumines 2S allergéniques ont été décrites et partiellement caractérisées : Bra n 3, Ric c 1 et Ric c 3, Jug r 1, SFA8 du tournesol aussi bien que les albumines du sésame (Mills et Shewry, 2004).

L'allergénicité des albumines 2S pourrait être en grande partie due à leur compactage structural maintenu par les ponts disulfures. Cette propriété leur confère une résistance inhabituelle à la dénaturation thermique et à la digestion par des enzymes protéolytiques. Ces deux propriétés jouent un rôle « clé » dans l'allergénicité des aliments. En effet, les protéines peuvent ainsi atteindre, pratiquement intactes, le tractus gastro-intestinal.

Les albumines 2S constituent donc une famille très importante d'allergènes qui sont structurellement proches d'autres protéines de plantes. Il reste à approfondir leur caractérisation afin de mieux comprendre leur propriété antigénique et allergénique.

### **d) Les allergènes de l'arachide**

L'arachide (*Arachis hypogaea*) est une légumineuse de la famille des papilionacées comme les pois, les lentilles, le lupin, le soja, la réglisse, le caroubier. La graine d'arachide, la cacahuète, est composée en moyenne de 25% (précisément de 23 à 27%) de protéines (Souci, 1994). Il s'agit de protéines de réserve appartenant aux deux grandes familles des globulines 7S et 11S (viciline et glycinine) et des albumines 2S (conglutine).

Les protéines de réserve majoritairement présentes dans la graine d'arachide ont été, dans un premier temps, subdivisées en arachine et conarachine (Johns et Jones, 1916). Ces deux protéines sont des globulines qui s'associent réversiblement en solution qui représenteraient plus de 75% des protéines de la graine. L'arachine est décrite par Yotsuhashi et Shibasaki (1976) comme une entité de masse moléculaire 180 kDa sous forme monomérique et de point isoélectrique (pHi) 5,1. L'arachine se présenterait sous deux formes polymériques A et B qui peuvent être dissociées en 6 sous-unités de masse moléculaire variant entre 20 kDa et 71 kDa.

La conarachine a été caractérisée par Johnson et Naismith (1954) comme une entité protéique de 295 kDa présentant un pHi à 3,9. Cette protéine serait elle-même constituée de 7 sous-unités. Outre ces protéines quantitativement majeures, l'arachide possède une chimie protéique complexe comprenant plus de 30 protéines différentes. Plus de 10 d'entre elles sont capables de fixer les IgE d'individus sensibilisés (Kleber-Janke et *al.*, 1999).

De nombreuses équipes ont travaillé sur l'identification et la caractérisation des allergènes des l'arachide. Mais cette caractérisation a été initiée par (Sachs et *al.*, 1981). Cette équipe a démontré les propriétés allergéniques d'une protéine, « Peanut I », complexe de 180 kDa à l'état natif présentant 2 sous-unités de 20 et 30 kDa par technique électrophorétique en conditions réductrices.

En 1983, Barnett et *al.* (1983) démontrent le potentiel allergénique de l'arachide, de la conarachine et d'une glycoprotéine réactive à la concanavaleine A (Con A) par technique de type CRIE (Crossed RadioImmunoElectrophoresis). Par la suite, Burks et *al.* (1991) mettent en évidence une fraction immunoréactive par test ELISA et immunoempreinte après électrophorèse en gel de polyacrylamide et IEF (isoélectrofocalisation). Cette fraction possède un poids moléculaire de 63,5 kDa et un pHi de 4,55. Conformément aux recommandations du Comité International IUIS (International Union of Immunological Societies), l'allergène ainsi identifié est nommé Ara h 1 et appartient à la famille des globulines 7S. Il faut toutefois noter que l'Ara h 1 s'est révélé identique à la glycoprotéine réactive à la Con A décrite par Barnett et *al.* (1983).

Ara h 2, de masse moléculaire 17 kDa et de pHi 5,2, est isolé par Burks et *al.* (1992) et appartient à la famille des albumines 2S. Quelque soit la variété d'arachide utilisée, Ara h 2 se présente en électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme un doublet à 17 et 20 kDa, expliquées par Koppelman et *al.* (2001) par des différences structurales mineures ; Tout comme Ara h 1, Ara h 2 est décrit comme un allergène majeur de l'arachide. Les travaux biochimiques concernant Ara h 1 et Ara h 2 ont été complétés par le clonage des gènes correspondant et la production d'allergènes recombinants (Burks et *al.*, 1995) (Kleber-Janke et *al.*, 1999).

L'utilisation de ces mêmes approches de biologie moléculaire a permis de caractériser de nouveaux allergènes (Ara h 3 à Ara h 7). Ara h 3 présente une masse moléculaire de 58 kDa et un pHi de 5,5, et appartient à la famille des globulines 11S (Rabjohn et *al.*, 1999). Ara h 4 de masse moléculaire 61 kDa est une isoforme de Ara h 3 possédant 91% d'homologie avec elle et 56% d'homologie avec la famille des globulines 11S (Kleber-Janke et *al.*, 1999). Ara h 5 est une profiline de 14 kDa tandis que Ara h 6 et Ara h 7 font partie de la famille des

albumines 2S avec des masses moléculaires respectives de 14,5 kDa et de 15,8 kDa (Kleber-Janke *et al.*, 1999). L'immunoréactivité des IgE de patients allergiques étudiée avec des protéines recombinantes par immunoempreinte montre une fréquence de reconnaissance de 44% pour Ara h 3 (Rabjohn *et al.*, 1999), 53% pour Ara h 4, 13% pour Ara h 5, 38% pour Ara h 6 et 43% pour Ara h 7 (Kleber-Janke *et al.*, 1999).

Durant les trois années de cette thèse, les caractérisations des allergènes de l'arachide ont bien progressé. Ainsi, les allergènes Ara h 3 et Ara h 6 ont été étudiés par voie biochimique, c'est-à-dire extraits et purifiés à partir de la graine d'arachide (Koppelman *et al.*, 2003) (Suhr *et al.*, 2004) (Koppelman *et al.*, 2005) (Piersma *et al.*, 2005). Leur immunoréactivité a été évaluée à l'aide de sérums de patients allergiques. Trente cinq pour cent des patients réagissent avec Ara h 3 en immunoempreinte (Koppelman *et al.*, 2004) ce qui est plus faible que la fréquence décrite avec Ara h 3 recombinant. Concernant Ara h 6, pour 54% des sérums humains, les IgE détectent la protéine purifiée (Suhr *et al.*, 2004). Un nouvel allergène, Ara h 8, homologue à Bet v 1, a été récemment cloné et est reconnu par 85% des patients par détection immuno-enzymatique de type Cap-FEIA (Pharmacia) et par 75% en immuno-empreintes (Mittag *et al.*, 2004).

### 3. Les allergènes du lait de vache

Le lait de vache est une source animale d'allergènes ce qui explique des propriétés et des caractéristiques bien différentes des allergènes de plantes. Le lait de vache contient 30 à 35 g.l<sup>-1</sup> de protéines, qui peuvent être séparées par acidification à pH 4,6 en deux fractions : le lactosérum (20% des protéines totales) et le lait caillé ou coagulé (80% des protéines totales). Le lactosérum contient essentiellement les protéines globulaires, à savoir 10% de  $\beta$ -lactoglobuline (blg) et 5% d'alpha-lactalbumine ( $\alpha$ -lac), protéines directement produites dans la glande mammaire de la vache, 3% d'immunoglobulines produites dans le sang, 1% de sérum albumine et des traces de lactoferrine. Le lait coagulé renferme la fraction caséine entière.

La blg appartient à la famille des lipocalines, petites molécules sécrétées pouvant s'associer à des ligands hydrophobes. Elle est considérée comme une protéine ligand du rétinol (« retinol-binding protein »). La blg apparaît naturellement sous la forme de dimère de 36 kDa. Il existe différents variants de la blg, le variant A et le variant B, qui se différencient seulement par deux mutations sur les résidus en position 64 (variant A : acide aspartique/ glycine) et en position 118 (variant A : valine/ alanine). La blg possède deux ponts disulfures ainsi qu'une

cystéine libre. Cette structure est responsable de l'interaction avec les caséines pendant les traitements thermiques.

La fraction caséine entière comporte quatre protéines différentes :  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caséine qui représentent respectivement 32%, 10%, 28% et 10% des protéines totales du lait et qui montrent peu d'homologie de séquences en acides aminés (Wal, 1998). Elles se lient entre elles pour former des agrégats (micelles) en suspension dans le lactosérum. Ces micelles comprennent une partie centrale hydrophobe et une couche périphérique hydrophile, incluant les sites majeurs de phosphorylations. La présence de ces sites majeurs de phosphorylation est une caractéristique commune aux caséines sensibles au calcium. Ils apparaissent comme étant des épitopes importants des caséines, et leur altération affecte l'allergénicité des caséines (Bernard *et al.*, 2000). La masse moléculaire de ces 4 protéines est respectivement 23,6 kDa, 25,2 kDa, 24 kDa et 19 kDa. Seules les caséines  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$  possèdent un pont disulfure. Les caséines ne sont pas affectées de manière significative par les traitements thermiques sévères mais sont très sensibles aux protéases et exopeptidases.

L' $\alpha$ -lactalbumine est une protéine globulaire monomérique de masse moléculaire de 14,4 kDa comportant quatre ponts disulfures. Sa séquence en acides aminés présente de fortes homologies avec le lysozyme du blanc d'œuf de poule, mais aussi avec l' $\alpha$ -lactalbumine humaine.

La lactoferrine est une glycoprotéine de la famille des transferrines se liant au fer. Elle est présente à de très faibles concentrations dans le lait de vache.

Les protéines du lait de vache sont d'une manière générale assez hétérogènes et ont peu de caractéristiques structurales et fonctionnelles communes (Wal, 2001). Plusieurs travaux ont porté sur l'immunoréactivité de ces multiples composants. Les études réalisées sur de larges populations de patients allergiques montrent que la plupart des patients sont sensibilisés à de nombreuses protéines du lait. Les allergènes les plus représentés au sein du lait et reconnus par les IgE de patients sont la fraction caséine (reconnue par 66%), la blg (reconnue par 58% des patients) et l' $\alpha$ -lactalbumine (reconnue par 38%) mais des protéines du lait plus minoritaires comme la sérum albumine bovine ou la lactoferrine sont reconnues respectivement par 50% et 45% des patients (Wal *et al.*, 1995). Les intensités de réponse des IgE spécifiques des différentes caséines varient fortement en fonction des sérums et des caséines mais semblent être reliées aux proportions relatives de ces protéines dans le lait (Bernard *et al.*, 1998).

## V. Conclusion et objectifs de la thèse

A travers cette introduction bibliographique, nous avons pu voir que les allergies alimentaires, dont les mécanismes d'induction sont majoritairement dus aux IgE, sont souvent les premières manifestations d'allergie pour les très jeunes enfants. Leur prévalence, qui n'a cessé d'augmenter ces dernières années, et la gravité des manifestations cliniques les classent comme un problème majeur de Santé Publique. Néanmoins, l'allergie à l'arachide est une des plus importante de par la gravité de sa symptomatologie (63% des chocs anaphylactiques alimentaires fatals) et de par sa persistance au cours de la vie (20% de rémission). C'est la raison pour laquelle cette allergie a été choisie comme modèle d'étude pour cette thèse.

Nous avons pu voir la diversité des protéines de l'arachide. Avant de commencer ces travaux de thèse, les approches de la biologie moléculaire ont permis de mettre à jour encore de nouveaux allergènes de l'arachide. Cependant, de nombreux points restent à clarifier. D'une part, l'isolement et la caractérisation des allergènes recombinants de l'arachide ne permettent pas de définir fidèlement l'immunoréactivité réelle de l'arachide. En effet, les protéines naturelles suivent un processus de modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycosylations...) qui n'existent pas pour des protéines recombinantes exprimées par des bactéries. Il en résulte, dans certains cas, une différence d'immunoréactivité entre protéines naturelles et recombinantes. De ce fait, l'extraction biochimique et l'identification des allergènes déjà décrits étaient et restent d'actualité. D'autre part, les allergènes déjà caractérisés ne permettent pas de représenter l'intégralité de l'allergénicité de l'arachide. En effet, hormis les travaux de Sachs (1981) et ceux de Barnett (1983), l'étude de l'immunoréactivité des gros polymères (arachine et conarachine) et de leurs sous-unités n'a pas été menée à ce jour. Par exemple, il n'a pas été clairement établi si les allergènes décrits existent en tant qu'entité propre ou bien s'ils représentent des sous-unités de l'arachine et de la conarachine.

Enfin, la relation entre l'importance relative des différents allergènes avec la symptomatologie des patients reste à établir. Ces travaux vont constituer la première partie de ce manuscrit, à savoir la purification et la caractérisation biochimique des protéines de l'arachide puis la mise en évidence des allergènes de l'arachide à l'aide d'un large échantillonnage de sérums de patients allergiques à l'arachide.

Dans la seconde partie, nous analyserons plus particulièrement les épitopes des allergènes de la famille des albumines 2S, à savoir Ara h 2 un allergène majeur de l'arachide, et des globulines 11S, à savoir Ara h 3.

Enfin, la troisième partie de ce manuscrit portera sur l'étude de la résistance des allergènes lors des traitements thermiques et lors des processus de digestion pour deux modèles l'arachide et le lait de vache. Cette étude qui correspond aux travaux réalisés dans le cadre du programme européen Allergest permettra d'étudier et de comparer la résistance à la digestion des allergènes alimentaires pour deux types d'allergie alimentaire : une d'origine animale, l'allergie au lait de vache et une d'origine végétale, l'allergie à l'arachide, pour lesquelles l'âge d'apparition, la gravité des symptômes et la persistance au cours de la vie sont si différentes.

Les premiers objectifs de la thèse visent à caractériser les principaux allergènes de l'arachide, à décomposer la réponse IgE spécifique afin d'évaluer la part des différentes familles protéiques dans l'allergénicité de l'arachide. La purification et l'identification des allergènes ont été réalisées par des méthodes biochimiques d'extraction et de purification des protéines à partir de la graine. Une telle démarche devrait permettre d'obtenir la représentation la plus fidèle possible des allergènes de l'arachide en tenant compte de leurs existences sous de multiples formes notamment dégradées et associées.

L'étude de ce chapitre se décompose en deux parties successives. Une première partie, pierre angulaire de l'étude, rapporte la purification et l'identification de nombreuses protéines de l'arachide. Une deuxième partie évalue l'immunoréactivité des entités protéiques isolées et identifiées à l'aide de tests *in vitro*. Cette dernière approche est complétée par des analyses *in vivo* de réactivité cutanée de patients allergiques à l'encontre de protéines représentatives des principales familles protéiques de l'arachide.

## **A. PURIFICATION DES PROTEINES DE L'ARACHIDE**

### **I. Extraction des protéines et purification des allergènes de l'arachide : le contexte**

Le « fractionnement d'Osborne » a constitué très rapidement la référence des méthodes d'extraction et de purification des protéines des plantes. Cette procédure, décrite par Osborne en 1924, assemble différentes méthodes d'extraction en un fractionnement séquentiel. Elle s'applique à tout matériel de graines broyées et s'appuie sur les différentes propriétés de solubilité des familles de protéines de plantes. Les albumines sont extraites uniquement dans l'eau, les globulines dans des solutions salines de concentration en NaCl de 0,5 à 1 M et les prolamines dans une solution d'alcool, généralement de l'éthanol à 60-70%, enfin, les glutélines dans des solutions diluées d'acides ou de bases. Seule une très faible proportion des protéines totales reste dans le résidu. Cette procédure a souvent été modifiée, notamment en remplaçant l'éthanol par d'autres alcools comme le propanol-1 (50%, v/v), en incluant des agents réducteurs pour séparer les sous-unités des polymères associées par des ponts disulfures présentes dans les extraits de prolamines, ou encore en extrayant les glutélines avec

des détergents (comme le SDS, le CHAPS) et/ou des agents chaotropiques (comme l'urée, le thiourée) à la place d'acides ou de bases qui peuvent provoquer des dégradations partielles.

Les extractions des protéines de l'arachide, tout en s'appuyant sur les propriétés précédemment décrites, ont mis en jeu des méthodologies propres à cette légumineuse. En 1953, Arthur regroupe dans une revue toute la méthodologie décrite jusqu'à 1951 tandis que Bhushan et al. (1988) recouvre la littérature de 1951 à 1985. Les extractions protéiques de l'arachide nécessitent l'élimination préalable des lipides, constituants majeurs de l'arachide. L'influence de différents solvants sur la dénaturation des protéines de l'arachide nous a ainsi orientés sur une méthodologie de délipidation impliquant l'éther (Basha et Pancholy, 1981). L'extraction des protéines proprement dite a fait appel aux premiers travaux de Basha et Al Wandawi (1976). Ces auteurs étudient les différents milieux d'extraction pour préparer l'arachine et la conarachine, gros polymères protéiques décrits durant cette période. Ils ont également analysé et comparé les propriétés physico-chimiques et électrophorétiques de ces protéines en gel de polyacrylamide aussi bien que leur composition en acides aminés et carbohydrates. Les extraits protéiques totaux contenant beaucoup d'arachine et de conarachine sont obtenus en homogénéisant les tourteaux délipidés d'arachide dans un tampon phosphate de sodium 20 mM contenant 1 M de NaCl pH 7,0 à un ratio d'extraction 1/18 (poids/volume, p/v). Ces conditions optimales de pH et de ratio ainsi définies ont constitué la méthodologie de base adoptée pour nos extractions.

De façon plus spécifique, l'extraction et la purification des allergènes de l'arachide ont réellement commencé en 1981 avec Sachs et al. (1981) et ont été poursuivies par voie biochimique pour les différents allergènes Ara h 1 (Burks et al., 1991), Ara h 2 (Burks et al., 1992a) et récemment Ara h 3 (Koppelman et al., 2003) (Piersma et al., 2005) et Ara h 6 (Suhr et al., 2004) (Koppelman et al., 2005).

L'allergène Peanut I a été isolé à partir de tourteau d'arachide crue délipidé, lyophilisé (Sachs et al., 1981). Les protéines de ce tourteau ont été extraites à un ratio 1/10 (p/v) dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,75 sous agitation magnétique pendant 36 h à +4°C. Peanut I a été obtenu à la suite de deux chromatographies d'échange d'anion de type DEAE cellulose et d'une électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide.

La glycoprotéine réactive à la concanavoline, identifiée par la suite comme étant Ara h 1, a été isolée à partir d'un extrait obtenu par extraction en bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 pendant 4 h (ratio 1/9, p/v). La purification a été menée sur colonne d'affinité concanavoline A-Sepharose. La description de la purification d'Ara h 1 a été également publié par Burks et al. (1991). Les protéines d'arachide sont extraites dans un tampon phosphate de sodium 20

mM pH 7,0 contenant 1 M de NaCl et 8 M d'urée pendant 4 h à +4°C. Cet extrait protéique est purifié par chromatographie d'échange d'anion utilisant une colonne Mono Q 10/10 (Pharmacia) avec un gradient de NaCl de 0 à 1,5 mol.l<sup>-1</sup>. L'allergène Ara h 1 est alors identifié dans une des fractions obtenues.

Nous retiendrons la chromatographie d'affinité concanavale A-Sepharose comme étape d'épuisement simple de l'extrait protéique en allergène Ara h 1.

Burks et al. (1992a) ont isolé l'allergène Ara h 2 en appliquant les mêmes étapes de purification développées pour Ara h 1. La phase solide utilisée pour la chromatographie d'échange d'anion est une PL-SAX (BioRad) dont l'élution est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 1,5 M. En 2002, Sen et al. purifient Ara h 2 à partir d'un extrait protéique précipité au sulfate d'ammonium de 40% à 70%, puis fractionné par chromatographie d'échange d'anion sur phase HighQ (BioRad) dont l'élution est réalisée avec un gradient linéaire de 40 à 140 mM de NaCl. Cette purification est achevée par chromatographie d'interaction hydrophobe sur un gel Phenyl-Sepharose (Pharmacia) dont l'élution est réalisée avec un gradient de 3 à 0 M de NaCl.

Au vu des études décrites dans ce chapitre, nous pouvons constater l'hétérogénéité des méthodes d'extraction et de purification, employées en fonction de l'allergène concerné. Le but de notre travail est de mener une combinaison originale de méthodes d'extraction et de purification afin de caractériser des allergènes décrits uniquement par voie de la biologie moléculaire ou non décrits à ce jour. Notre travail ne se voulant pas restrictif à un allergène en particulier, nous procéderons tout d'abord à une étude de différents tampons d'extraction, en s'aidant du fractionnement d'Osborne, pour déterminer celui qui est le plus adapté à la purification des différents membres protéiques de l'arachide. Une phase de précipitation au sulfate d'ammonium sera retenue pour commencer le fractionnement des protéines de l'arachide. Enfin, nous développerons des méthodes de purification sélectives ou résolutive en combinant une chromatographie d'affinité concanavale A-Sepharose, une chromatographie échangeuse d'anion et une chromatographie en phase inverse. Les différentes étapes seront ponctuées par des analyses électrophorétiques, associées ou non à des techniques d'identification des protéines (spectrométrie de masse et séquençage).

## II. Matériels et méthodes

### 1. Préparation du tourteau d'arachide

Les graines d'arachide grillée (commerciales) issue de variété virginienne sont d'abord grossièrement pilées. Le broyage est ensuite finalisé à l'UltraTurrax jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène. Cette pâte est alors mise en suspension dans de l'éther (1/5, p/v) pendant une minute à température ambiante puis l'ensemble est centrifugé à 4000 g à +4°C pendant 15 minutes. Les lipides de l'arachide présents dans le surnageant sont ainsi séparés de la partie protéique du culot. L'opération de délipidation est répétée après remise en suspension du culot dans de l'éther. Les culots sont ensuite laissés sous la sorbonne pendant 12 heures pour laisser un maximum d'éther s'évaporer avant de procéder ensuite à l'extraction protéique.

### 2. Mise au point des conditions d'extraction

La mise au point des conditions permettant le meilleur rendement et la meilleure représentation des protéines de l'arachide a été axée sur la modification de la composition du tampon d'extraction. Le temps, la température et le volume d'extraction, et le solvant pour la délipidation ont été déterminés à l'aide des études décrites dans la littérature présentées précédemment ou d'expériences préalables. Le ratio d'extraction (masse d'arachide/volume d'extraction) a ainsi été défini à 1/25, le temps d'extraction à 4 heures et la température à +4°C. Les tampons utilisés, répertoriés dans le tableau suivant, se distinguent par la présence ou non d'agents salins, chaotropiques ou de détergents.

Tableau 7: différents tampons et solution d'extraction testés lors de l'extraction protéique de l'arachide.

1	Eau milliQ (Millipore)	
2	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM	pH 7,4
3	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM, NaCl 1M	pH 7,4
4	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM, NaCl 1M, urée 4M	pH 7,4
5	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM, NaCl 1M, thiourée 2M	pH 7,4
6	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM, NaCl 1M, urée 4M, thiourée 2M	pH 7,4
7	Tampon PO <sub>4</sub> 20mM, NaCl 1M, urée 4M, thiourée 2M, CHAPS 0,1%	pH 7,4

En détail, un gramme de tourteau délipidé est repris dans 25 ml de chaque tampon. Le mélange est homogénéisé à l'UltraTurrax. Après addition d'azide de sodium à 0,01% final et d'EDTA 1 mM, le mélange est mis sous agitation à +20°C pendant 4 h. La fraction soluble contenant une grande partie des protéines est isolée de la partie insoluble par centrifugation à

15000 g et +4°C pendant 40 minutes. Le surnageant est collecté et filtré sur papier Whatman. Les surnageants issus des tampons d'extraction 3 à 7 sont dialysés à +4°C dans des boudins présentant un seuil de coupure à 3,5 kDa (Spectra/Por Membranes) contre 5 l de tampon phosphate 20 mM pH 7,4 contenant 0,01% d'azide. La dialyse est menée pendant 24 h avec trois changements de bain.

### 3. Purification des protéines de l'arachide

#### a. Protocole général

La purification des protéines est réalisée par combinaison de précipitations et de méthodes chromatographiques, selon le schéma de la figure 11. Chaque étape de purification est détaillée par la suite.

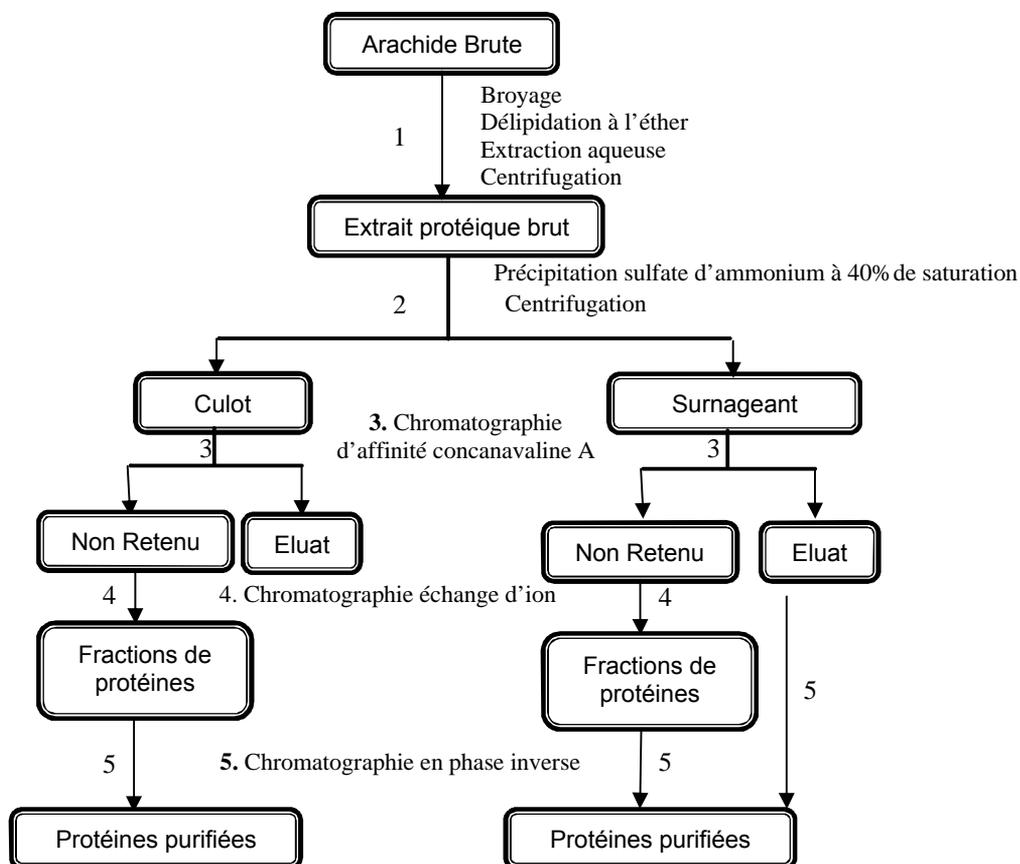


Figure 11 : schéma du protocole général de purification des protéines de l'arachide. L'arachide brute peut être grillée, crue ou bouillie.

### ***b. Fractionnement des protéines par précipitation au sulfate d'ammonium***

La purification des protéines débute par une précipitation au sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (étape 2, figure 11). La fraction protéique brute précédemment dialysée est traitée par addition progressive de 243 g de sulfate d'ammonium par litre de solution (correspondant à une concentration finale de 40% de solution saturée). Après deux heures d'agitation à +4°C, le précipité est séparé de la fraction soluble par centrifugation à 4000 g et +4°C pendant 30 minutes. Le surnageant collecté est dialysé (seuil de coupure 3,5 kDa) contre 5 l de tampon phosphate 20 mM pH 7,4 contenant 0,01% d'azide de sodium. La dialyse est effectuée pendant 48 heures avec 5 changements de bain. Le culot est repris dans du tampon Tris 20 mM pH 7,4 puis dialysé dans les mêmes conditions que le surnageant. A la suite de la dialyse, les différents échantillons sont lyophilisés.

### ***c. Chromatographies***

- Affinité (étape 3, figure 11)

La purification d'Ara h 1 s'effectue à l'aide d'une lectine (concanavaleine A) couplée à un gel de type Sepharose (Con A-Sepharose). Cette chromatographie d'affinité repose sur l'interaction spécifique entre les carbohydrates de l'allergène Ara h 1 et la lectine greffée sur le gel Sepharose. L'élution de la protéine est effectuée par rupture de l'interaction protéine/ligand à l'aide d'un éluant spécifique, un pyranose. Cette purification par affinité est effectuée sur le surnageant 40% et le culot 40% précédemment obtenus. L'élution des différentes entités est suivie par détection à 280 nm.

Le lyophilisat est repris dans du tampon phosphate 40 mM pH 7,4 contenant 0,5 M de NaCl et mis en présence avec le gel Con A-Sepharose (10 ml de gel pour 250 mg de protéines). Après dépôt sur colonne, la fraction non retenue est collectée, puis le gel est lavé jusqu'au retour de la densité optique à 280 nm à sa ligne de base. L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon Tris/HCl 40 mM pH 7,4 contenant 0,5 M de méthyl- $\alpha$ ,D-mannopyranoside à un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>.

La fraction non retenue et l'éluat (entité ayant interagi avec la concanavaleine A) sont conservés pour la suite des étapes de purification et d'analyse.

- Echange d'ion (étape 4, figure 11)

La purification est poursuivie sur la fraction non retenue sur Con A sepharose du surnageant 40% et du culot 40%, préalablement dialysée, à l'aide du système AKTA (Pharmacia). Ce fractionnement des différentes protéines s'effectue sur une colonne échangeuse d'anion (Q Sepharose) équilibrée en tampon Tris 50 mM pH 8,0 contenant de l'urée 4 M. Les différentes entités protéiques reprises dans ce même tampon et injectées sur la colonne sont éluées avec un débit de 8 ml.min<sup>-1</sup> par paliers de 0, 50, 100, 200, 300 et 1000 mM de NaCl additionné dans le tampon initial pour le surnageant et par gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl additionné dans le tampon initial pour le culot. L'éluion est suivie par mesure d'absorbance à 235 nm et 280 nm, et des fractions de 40ml sont collectées.

- Phase inverse (étape 5, figure 11)

La purification des différentes fractions protéiques obtenues sur système AKTA (Pharmacia) est achevée par chromatographie HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en phase inverse sur colonne préparative (C4 Vydac 250x10 mm) équilibrée en tampon A (H<sub>2</sub>O/TFA 0,1%). Les échantillons repris dans le tampon A sont élués à un débit de 8 ml.min<sup>-1</sup> par un gradient linéaire de 0 à 60% de tampon B (acétonitrile/TFA 0,04%). Les fractions sont collectées chaque minute et le suivi de l'éluion se fait par mesure d'absorbance à 235 nm et 280 nm.

## **4. Caractérisation des fractions isolées et des protéines purifiées**

L'identification des protéines et peptides isolés ainsi que l'analyse de leur pureté ont été réalisées à l'aide de différentes techniques biochimiques.

### **a) Dosage des protéines**

Après chaque étape de purification, la concentration protéique des différentes fractions obtenues est déterminée à l'aide d'un kit de dosage (BCA Protein Assay Kit, PIERCE) utilisant la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode combine la réduction de l'ion cuivrique Cu<sup>2+</sup> en ion cuivreux Cu<sup>+</sup> dans un milieu alcalin (réaction de Biuret). La

détection colorimétrique fortement sensible et sélective du cation cuivreux  $\text{Cu}^+$  utilise un réactif unique contenant l'acide bicinchoninique (Smith et al., 1985). Le produit de la réaction est formé par chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux. Le complexe formé absorbe fortement à 562 nm dans une gamme de concentration linéaire entre  $20 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  et  $2 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$ .

Une gamme étalon réalisée avec une protéine standard, la sérum albumine bovine (SAB), à des concentrations variant de 0 à  $1 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$  permet d'estimer la concentration protéique dans les échantillons.

### ***b) Séquençage des acides aminés amino-terminaux***

Les protéines purifiées ont été partiellement séquencées par le Dr. Robert THAI du Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines (DIEP) du centre d'Etude de Saclay selon la méthode d'Edman à l'aide d'un séquenceur PROCISE (Applied Biosystems).

### ***c) Détermination des masses moléculaires par spectrométrie de masse***

- principe

La spectrométrie de masse mesure la masse de molécules en déterminant le rapport masse/charge ( $m/z$ ). Un spectromètre comporte une source d'ionisation chargée de générer des ions moléculaires à partir de l'échantillon, un analyseur assurant la séparation de ces ions moléculaires en fonction de leur ratio  $m/z$  individuel et un détecteur qui transmet les enregistrements à un système de traitement de données. Nous employons un système Voyager DE STR (Applied Biosystems) basé sur la technique MALDI-TOF qui allie un mécanisme d'ionisation de l'échantillon par désorption laser assistée par la matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) et un mécanisme de détection et d'analyse par temps de vol (Time-Of-Flight). L'échantillon est « enchâssé » dans une matrice de faible masse moléculaire. Quand le laser frappe la matrice, un transfert d'énergie vers l'échantillon se produit, formant des ions moléculaires. Ces ions sont accélérés avec le même potentiel et se séparent en fonction de leurs ratio  $m/z$  respectifs, les plus « légers » atteignant en premier le détecteur.

- Mode opératoire

Les échantillons de protéines sont dialysés contre de l'eau afin d'éviter la présence de sels qui pourraient perturber l'analyse de l'échantillon au spectromètre de masse. La matrice correspond à un mélange de 400 µl d'eau, 100 µl de TFA 3%, 500 µl d'acétonitrile et de 10 mg d'acide sinapinique (acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique) ou d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique. Un microlitre d'échantillon (de concentration comprise entre 0,1 et 10 pmol. $\mu$ l<sup>-1</sup>) et 1 µl de matrice sont déposés dans un des puits d'une plaque en acier inoxydable. La plaque est alors insérée dans l'appareil et quand le vide est suffisant, plusieurs tirs de laser sont réalisés. L'apparition des ions moléculaires est suivie sur l'écran permettant l'ajustement de l'énergie et le déplacement de la cible pour un résultat optimal. L'acquisition des spectres est sauvegardée pour une analyse des données par confrontation aux bases de données protéiques du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

#### ***d) Electrophorèses en gel de polyacrylamide***

Aux différentes étapes de la purification, la composition protéique des différentes fractions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS) et réductrices (présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol) avec un système vertical Mini Protean III (Biorad). L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970), modifiée par Dean et al. (1996). Le gel de séparation contient 12% ou 15% de polyacrylamide et le gel d'alignement 5%. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 95°C en bain-marie pendant 5 minutes avec un tampon concentré 4 fois (4X : Tris 0,25 M pH 6,8, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10%, glycérol 40%, bleu de bromophénol 0,01%).

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 14,4 kDa à 97 kDa (LMW Markers, Pharmacia Biotech) ou de 3 kDa à 188 kDa (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). Les échantillons sont déposés à raison de 20 µl pour les peignes de 10 puits et de 15 µl pour les peignes de 15 puits. Chaque échantillon est dilué de manière à ce que le volume de dépôt contienne 4 µg de protéine. La migration est effectuée à 80 V pour le gel d'alignement et 100 V pour le gel de séparation dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 0,192 M de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie. Les gels sont tout d'abord traités dans une solution de fixation correspondant à un mélange de 40% méthanol, 10% acide acétique et 50% eau milliQ pendant 30 minutes, puis colorés pendant 45 minutes avec une solution de Bleu de Coomassie R350 (Phast Gel Blue R, Pharmacia Biotech) à 10%

d'acide acétique, et enfin décolorés dans une solution d'acide acétique 10%. Les gels sont séchés à 60°C pendant 1 heure.

### **e) Analyse protéomique**

L'analyse protéomique associe la séparation des mélanges protéiques par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide et l'analyse de la composition peptidique de chaque spot protéique à l'aide d'un spectromètre de masse.

- Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines en deux temps : d'abord suivant leur point isoélectrique puis en fonction leur masse moléculaire. Toutes les étapes sont réalisées à l'aide de produits commercialisés par Invitrogen.

Cinq cents microgrammes d'un mélange de protéines (extrait brut) ou 2 µg de protéine purifiée, dialysés contre du tampon phosphate 20 mM pH 7,4 et lyophilisés, sont repris dans 160 µl de tampon de réhydratation (2% urée 8 M, 0,5% CHAPS (v/v), 20 mM DTT, 0,002% ampholytes 3-10 ou 4-7, bleu de bromophenol). Cette solution est mise en incubation avec une bandelette de gradient non linéaire de pH 3 à 10 ou pH 4-7 dans une cassette appropriée pendant 15 h à température ambiante.

L'isoélectrofocalisation, réalisée à l'aide du système IPG Runner, est menée à 500 V pendant 4 h. Puis, les bandelettes peuvent être conservées individuellement à -80°C ou utilisées immédiatement pour la séparation en gel de polyacrylamide.

Les bandelettes sont rééquilibrées en deux étapes:

- dans 5 ml de tampon LDS NuPAGE<sup>®</sup> réducteur (1X) (Tris HCl 26,5 mM, Tris base 35,3 mM, LDS 05%, glycérol 2,5%, EDTA 0,13 mM, Bleu SERVA<sup>®</sup> G250 0,055 mM, rouge de phenol 0,044 mM pH 8,5) sous agitation pendant 15 min à température ambiante.
- puis dans 5 ml de solution d'alkylation (116 mg d'iodoacétamide dans 5 ml de tampon LDS NuPAGE<sup>®</sup> 1X) sous agitation pendant 15 min à température ambiante.

Les bandelettes sont ensuite déposées dans le puits unique du gel pré-coulé, et la séparation selon la masse moléculaire est réalisée avec des gels de gradient de 4 à 12 % (NuPAGE<sup>®</sup>, Invitrogen). Les marqueurs de taille utilisés couvrent une gamme de masse moléculaire de 3 kDa à 188 kDa (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). La migration est menée à

200 V pendant 50 min dans un tampon de migration MES SDS (1X) (MES 2,5 mM, Tris base 2,5 mM, SDS 0,005%, EDTA 0,05 mM pH 7,3) (Invitrogen).

Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie décrite précédemment pour les gels de polyacrylamide une seule dimension (SDS PAGE). Les gels sont conservés dans de l'eau milliQ jusqu'à l'analyse de chaque spot par spectrométrie de masse.

- Digestion trypsique « en gel » et analyse de la carte peptidique par spectrométrie de masse

Les spots de protéines sont excisés du gel après la coloration au bleu de Coomassie (R350, Phast Gel Blue R, Pharmacia) et découpés en petits cubes. Les différents cubes sont déshydratés avec de l'acétonitrile puis séchés sous vide au SpeedVac, puis réduits à 56°C dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8 contenant 10 mM de dithiothreitol (DTT) pendant 30 minutes. Ils sont ensuite incubés dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8 contenant 55 mM d'iodoacétamide pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après ces étapes de réduction et de carbamidométhylation, les morceaux de gels sont lavés dans du tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8, déshydratés avec de l'acétonitrile et digérés par la trypsine (V5111, Promega) à 20 µg.ml<sup>-1</sup> pendant au moins une heure à 37°C. La solution de digestion est mélangée à un ratio 1/1 (v/v) avec de la matrice acide cyano-4-hydroxycinnamique (diluée à 1% (p/v) dans une solution de 50% acétonitrile, et de 0,3% TFA). Un microlitre de ce mélange est déposé dans un des puits d'une plaque en acier inoxydable.

L'analyse du spectre peptidique est réalisée par spectrométrie de masse MALDI TOF avec le spectromètre Voyager DE STR (Applied Biosystems). Les spectres sont acquis avec une détection d'ion positif en mode réflecteur.

Le spectre peptidique acquis est confronté à la base de données protéiques NCBI à l'aide des logiciels d'analyse protéomique ExPasy disponibles sur internet à savoir ProteinProspector/MSFit <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm> et Prowl/Profound [http://prowl.rockefeller.edu/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe) .

### III. Résultats et discussion

#### 1. Conditions d'extraction

Une première étude, dont les résultats ne sont pas présentés, a porté sur l'effet de la délipidation. Une partie des arachides grillées a été délipidée puis traitée en milieux aqueux tandis que l'autre partie n'a pas subi de délipidation par l'éther avant l'extraction aqueuse. La quantification protéique a montré que le rendement était augmenté de 8% lorsque les arachides étaient délipidées. De plus, l'analyse de la réponse IgE a montré que l'immunoréactivité ne semblait pas être influencée par ce traitement, qui a donc été retenu comme première étape avant l'extraction protéique.

Pour la préparation des protéines de l'arachide, il nous paraissait intéressant d'analyser l'effet du mode d'extraction sur le rendement et le contenu protéique. Aussi, 7 tampons ou solutions d'extractions différents, présentés dans la partie « matériels et méthodes », ont été utilisés.

Tableau 8: Quantité protéique obtenue avec les 7 tampons d'extraction.

Tampons	Masse traitée	Masse protéique extraite (mg)
1	1 g	100
2	1 g	102
3	1 g	123
4	1 g	142
5	1 g	134
6	1 g	117
7	1 g	122

En tenant compte de la teneur moyenne en protéine évaluée à 25% dans la graine d'arachide, nous pouvons estimer un rendement d'extraction variant entre 40 et 60%. Les rendements d'extraction les plus importants sont obtenus avec les tampons de milieu salin (tampon 3) et en présence d'agents chaotropiques (tampons 4-7) (tableau 8). Nous avons réalisé une électrophorèse en conditions dénaturantes et réductrices afin de comparer la composition protéique des différents extraits et ainsi déterminer la combinaison de tampons d'extraction permettant d'obtenir la meilleure représentation des protéines de l'arachide.

Ces extraits protéiques ont été dialysés avant la migration électrophorétique (figure 12). Au cours de la dialyse, tous les extraits ont précipité. Nous avons donc analysé séparément le contenu de la partie soluble et du précipité solubilisé dans de l'urée 4 M.

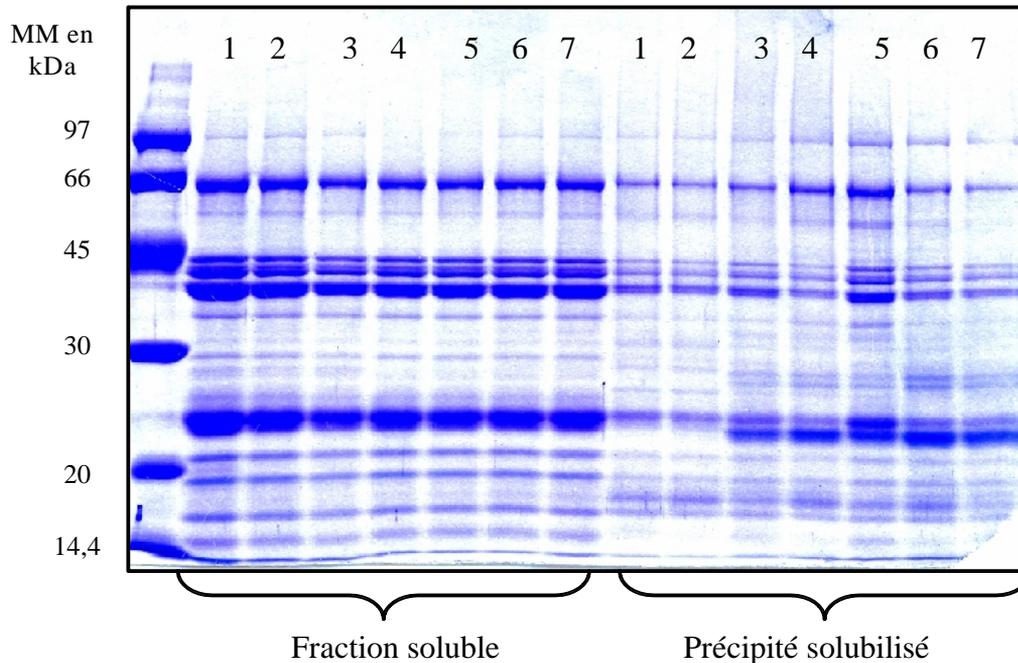


Figure 12 : électrophorèse des extraits protéiques obtenus avec les 7 tampons. Les 7 puits de gauche correspondent à la partie soluble du dialysat. Les 7 puits de droite correspondent aux précipités des extraits formés au cours de la dialyse.

Les profils électrophorétiques donnés pour la fraction soluble sont très similaires. Pour le précipité solubilisé, nous pouvons observer un nombre plus important de bandes protéiques migrant entre 20 et 30 kDa pour les extraits préparés à partir des tampons 3 à 7 et notamment de 4 à 7 (tampons contenant des agents chaotropiques).

A partir de ces résultats, nous avons décidé de combiner deux tampons d'extraction pour optimiser notre purification d'allergènes de l'arachide. Tout d'abord, nous avons procédé à une extraction en tampon phosphate contenant du NaCl (tampon 3), donc des conditions peu drastiques. Après centrifugation et collecte du surnageant, une deuxième extraction du culot est effectuée en milieu chaotrope afin d'extraire des protéines peu solubles dans les conditions initiales, notamment de masse moléculaire comprise entre 20 et 30 kDa. Le tampon choisi est le tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,4 contenant 1 M de NaCl et 4 M d'urée (tampon 4).

Le protocole d'extraction protéique employé comporte une étape préalable de délipidation à l'éther, car les travaux de Neucere (1969) et Jacks et al. (1982) ont montré un risque d'effet dénaturant de différents solvants tels que l'hexane.

Dans notre cas, aucune différence significative de composition protéique et d'immunoréactivité n'a été observée pour des extraits protéiques obtenus avec ou sans

délipidation. Les protéines solubles dans la fraction lipidique ne semblent pas représenter une part importante de l'immunoréactivité globale de l'arachide. Par contre, le traitement à l'éther a accru le rendement d'extraction protéique et a facilité, du fait de l'absence des lipides, les étapes ultérieures de purification.

Les conditions d'extraction proches de celles de Basha et Al Wandawi (1976) comprennent une succession d'étapes utilisant des tampons différents. Le rendement d'extraction global est amélioré par l'utilisation d'un deuxième tampon d'extraction contenant de l'urée et les protéines extraites par le premier tampon salin sont préservées de toute dénaturation par cet agent chaotrope.

## 2. Cartographie des protéines de l'arachide

Afin de mieux caractériser le contenu de l'extrait protéique ainsi obtenu à partir des arachides grillées, et éventuellement d'identifier les protéines et peptides le constituant, une électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée.

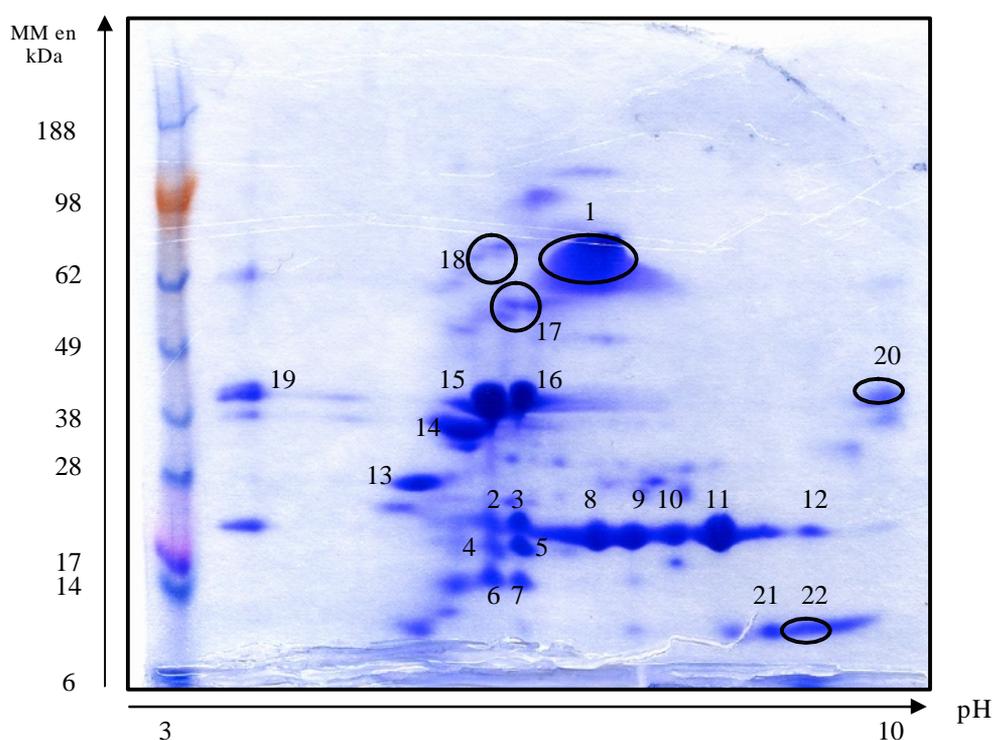


Figure 13 : électrophorèse bidimensionnelle de l'extrait d'arachide brute grillée dont la préparation est établie précédemment. Les différents spots analysés et identifiés sont numérotés de 1 à 22. Leur identification est reportée dans le tableau 9.

L'image électrophorétique montre une multitude de spots dispersés sur une grande zone de masses moléculaires et de pH. La majorité des spots s'échelonne entre les masses de 10 et 70

kDa et les pH isoélectriques entre 4 et 8. Toutefois, nous retrouvons des protéines aux pHi basiques (par exemple le spot n°20) et acides (par exemple le spot n°19) ainsi que des peptides de masse moléculaire inférieure à 6 kDa (spot n°22). Les spots protéiques séparés par électrophorèse bidimensionnelle (figure 13) ont été identifiés par analyse protéomique. Chaque spot, ainsi hydrolysé par la trypsine, engendre une carte peptidique analysée par spectrométrie de masse MALDI TOF dont les masses sont confrontées à la base de données protéiques du NCBI.

La démarche est détaillée, à titre d'exemple, pour le spot 6 dont la carte peptidique obtenue après acquisition au spectromètre de masse est représentée en figure 14.

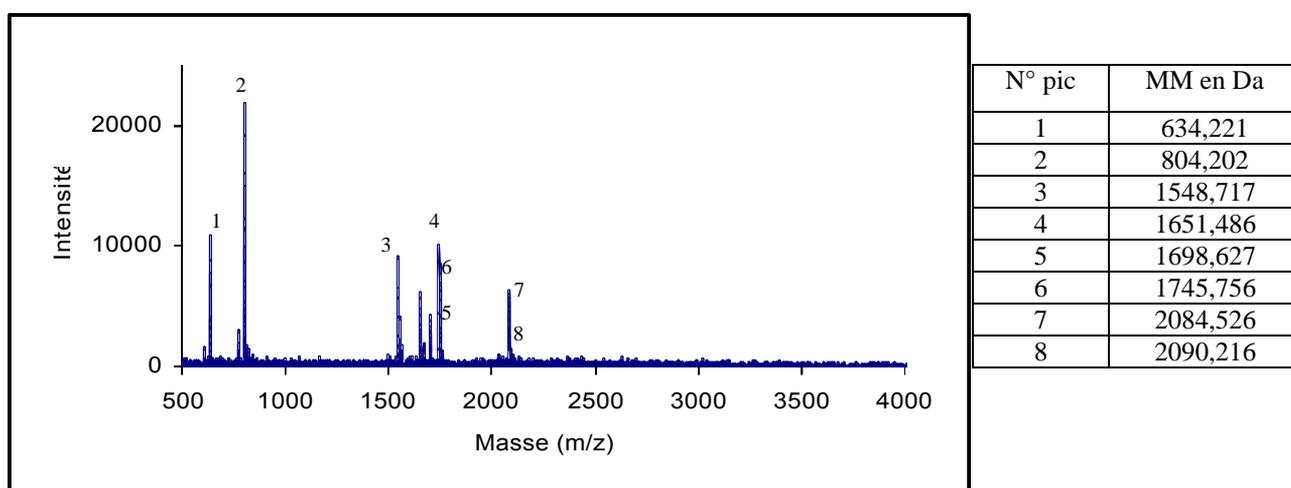


Figure 14 : profil peptidique en spectrométrie de masse MALDI TOF du digesta trypsique du spot 6.

Les résultats des données peptidiques du spot 6 analysées par le logiciel Profound se présentent sous forme de la page internet telle qu'en figure 15. La première information donnée est l'identité de la protéine analysée, à savoir la conglutine gi17225991/AF366561. Les peptides analysés recouvrent 49% de la séquence de la protéine. Les masses des peptides sont données avec leur zone de recouvrement et l'erreur de mesure par rapport à la masse calculée du peptide. Pour le spot 6, le logiciel a pu identifier 6 peptides parmi les masses analysées : les zones de recouvrement sont 41-53 (1651.486), 54-67 (1745.383), 78-90 (1698.329), 91-106 (2084.526), 119-130 (1548.508). La zone 54-70 (2090.216) est ensuite écartée pour nos analyses car l'erreur évaluée n'est pas homogène avec les erreurs évaluées pour les autres peptides. De même, les pics de masse 634.221 et 804.202 correspondent à des artéfacts générés par une quantité trop importante de bleu de Coomassie, lors de la préparation

de l'échantillon. En effet, nous avons contrôlé que le bleu de Coomassie déposé seul sur un des puits, présentait un spectre contenant uniquement ces deux pics.

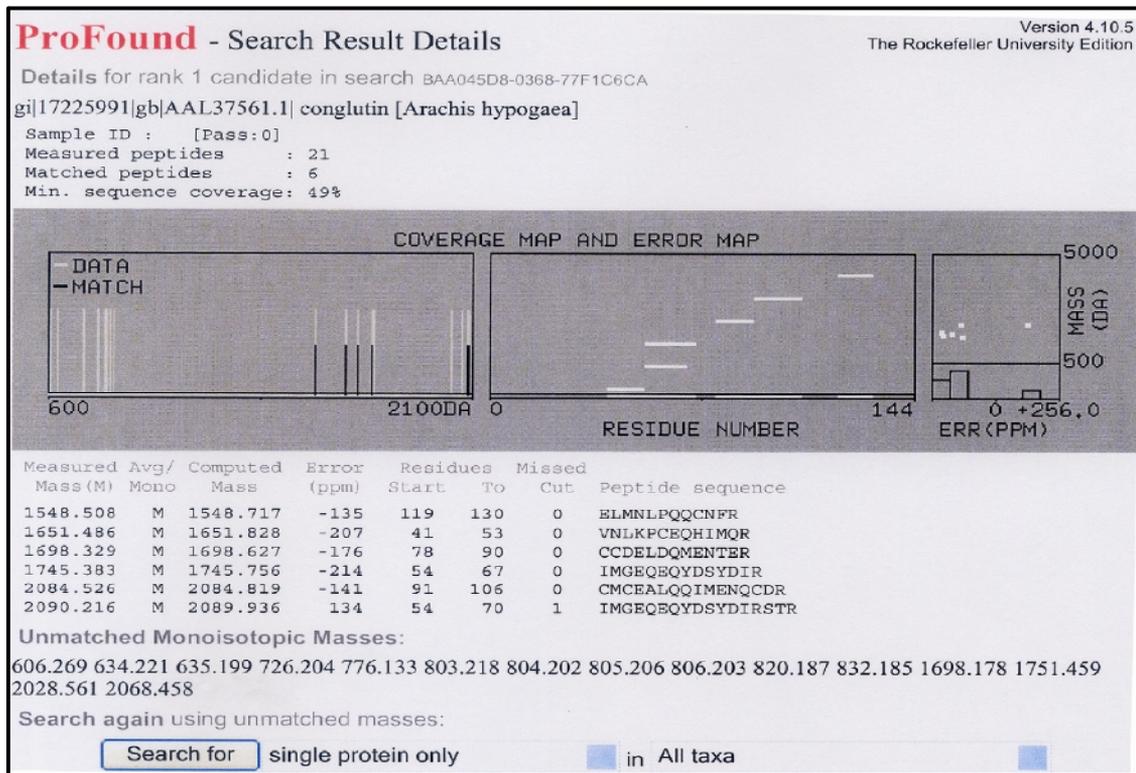


Figure 15 : page de résultats donnée par le logiciel ProFound lors de la confrontation de la carte peptidique obtenue après digestion trypsique et analyse au spectromètre de masse MALDI TOF pour le spot 6 de l'électrophorèse bidimensionnelle de l'arachide grillée.

La carte peptidique du spot 6 a été identifiée comme recouvrant 49% de la conglutine clone PSC33 (gi17225991/AF366561) et non Ara h 6 (gi5923742/AF092846). Ces deux protéines ont bien été caractérisées dans la graine d'arachide et présentent la même séquence amino-terminale ainsi qu'une similarité de 92%. Les différences reposent principalement sur la substitution de 11 acides aminés, dont 4 arginines, de la séquence de la conglutine PCS33 par 4 glycines. La carte peptidique générée par une coupure à la trypsine est donc significativement différente entre ces deux protéines. Ainsi, par la suite nous parlerons non pas d'Ara h 6 mais d'isoformes d'Ara h 6. Récemment, une nouvelle séquence d'une isoforme d'Ara h 6 a été référencée dans la base de donnée du NCBI : AY722690 par Yan et al. (2004). La séquence de cette isoforme correspond à la séquence de l'isoforme clone PSC33 avec des différences d'acides aminés en position 83, 84, 89 et 106 sur la figure 16 (ce qui équivaut aux positions 63, 64, 69 et 90 sur la séquence protéique sans le peptide signal) : N, E, Q, G pour ce nouveau variant d'Ara h 6 et D, Q, E, R pour la protéine issue du clone

PSC33. Les peptides générés lors de l'hydrolyse trypsique du spot 6, à l'exception peptide de masse moléculaire de 1698 kDa, sont retrouvées dans la séquence de cette protéine.

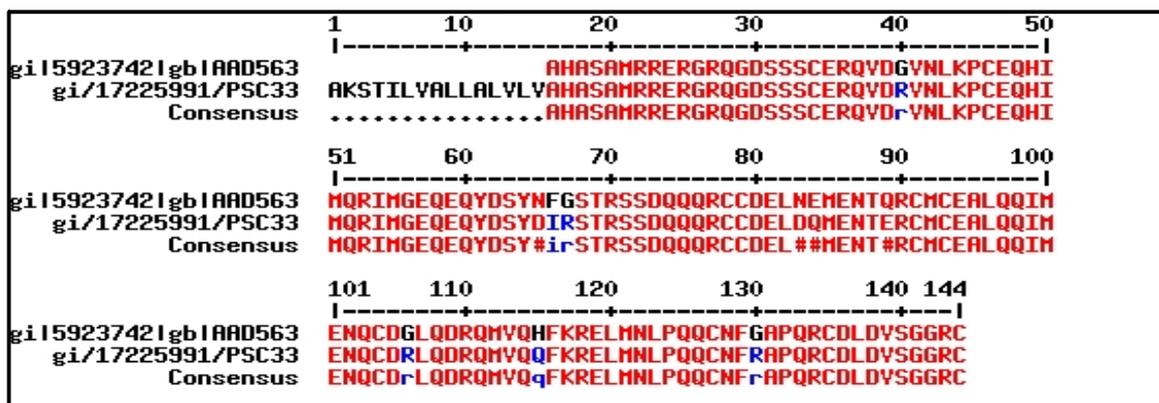


Figure 16 : alignement des séquences protéiques de l'allergène Ara h 6 (gi 5923742/AF092846) et de la conglutine clone PSC33 (gi17225991/Af366561) avec MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

Nous avons procédé aux mêmes analyses avec tous les spots numérotés sur le gel bidimensionnel (figure 13) dont les résultats sont répertoriés dans le tableau 9.

Tableau 9 : identification des spots protéiques du gel bidimensionnel de la figure 13.

N° du spot	Protéine identifiée	Recouvrement par les peptides	% de recouvrement de la protéine par les peptides
1	Ara h 1 (gi1168390)	109-115/132-137/147-160/166-174/199-207/249-259/260-271/282-301/302-312 /313-328/329-342/473-490/536-551	27
2	Ara h 2	38-50/79/89/80-90/90-100/101-113/114-129	33
3	Ara h 2	23-32/40-52/80-90/104-119/135-143	38
4	Ara h 2	90-90/91-103/104-119/124-131/135-143	37
5	Ara h 2	81-90/91-103/104-119/135-143	31
6	Conglutine PSC33 (gi17225991)	41-53 /54-67/78-90 /91-106 /119-130	49
7	Conglutine PSC33 (gi17225991)	41-53/54-67/91-106/119-130	38
8	Gly 1 (gi986477)	280-301/388-420/423-434	31
9	Gly 1 (gi986477)	402-421/436-458/459-470	13
10	Gly 1 (gi986477)	198-210/401-420/435-457/516-526	13
11	Gly 1 (gi986477)	362-376/377-387/388-400/401-420/435-457/458-469	19
12	Gly 1 (gi986477)	280-301/306-311/377-387/388-400	13
13	Gly 1 (gi986477)	197-210/211-216/280-301	7
14	Gly 1 (gi986477)	47-73/74-78/83-99/100-121/131-148/197-210/211-216/250-276/280-301/302-311	36
15	Gly 1 (gi986477)	38-46/47-73/280-286/302-311	14
16	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121/131-148/197-210	33
17	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121/198-210/302-311/377-387/400-420/435-457	13
18	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121/131-148/197-210	19
19	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121/131-148/197-210	20
20	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121/131-148/197-210/211-216/250-279/280-301	32
21	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/88-99/100-121	14
22	Gly 1 (gi986477)	26-37/47-73/83-99/100-121	14

Tous les spectres obtenus lors de l'analyse et conduisant aux résultats présentés dans le tableau 9 sont répertoriés dans l'annexe I. Toutes les séquences des peptides sont données par rapport à la séquence protéique de la base de données du NCBI qui inclut le peptide signal.

Le pourcentage de recouvrement est exprimé par rapport à la protéine entière. Les spots n°8 à n°22 de globuline 11S que nous avons analysés constituent, chacun, seulement un fragment de la protéine entière suite à une hydrolyse naturelle décrite par Koppelman et al. (2003). Il est donc normal d'observer des taux faibles de recouvrement de la protéine entière puisque les peptides générés proviennent uniquement d'un fragment de la globuline 11S.

Par ailleurs, l'absence de pourcentage de recouvrement très important (>90%) peut résulter aussi des différences de capacité d'ionisation des peptides générés par l'hydrolyse enzymatique lors de la désorption LASER au spectromètre de masse.

Le spot 17 présente des peptides localisés dans la région 26-457. Ce fragment peptidique posséderait alors une masse moléculaire de 50 kDa et un pHi de 5,3, ce qui est en accord avec l'image électrophorétique bidimensionnelle. Pour cette entité, le clivage entre les deux sous-unités n'a pas eu lieu, ce qui indique un processing incomplet de la protéine, phénomène observé par Koppelman et al. (2003).

La réalisation de la carte protéique de l'arachide nous amène à discuter de plusieurs points.

Il a été possible d'identifier 22 spots protéiques appartenant à 3 familles différentes d'allergènes de plantes (albumines 2S, globulines 7S et 11S) (tableau 9). Aucun représentant de la famille des profilines n'a pu être retrouvé. A ce jour, seuls quelques travaux de biologie moléculaire ont décrit une profiline dans l'arachide, nommée Ara h 5, dont la caractérisation sous forme de protéine réelle reste à affiner (Kleber-Janke et al., 1999) (Becker W.M. et al., 2001).

L'analyse de l'image électrophorétique permet de souligner la forte dispersion des membres de chaque famille protéique et donc l'hétérogénéité dans leur composition.

Les albumines 2S, dont l'un des membres (spot n°6) a été identifié en détail précédemment, sont représentées par une multitude d'isoformes et caractérisées dans les spots 2 à 7. Les albumines 2S se situent dans une zone restreinte de masse moléculaire inférieure à 20 kDa et de pHi relativement acide. Deux spots sont identifiés comme des isoformes d'Ara h 6 et quatre spots comme des isoformes d'Ara h 2. Pour les isoformes d'Ara h 6, les travaux récents de Suhr et al. (2004) montrent la même représentation. Ils ont détecté différentes

formes avec une séquence d'acides aminés amino-terminaux identique à celle d'Ara h 6. Les auteurs expliquent qu'un polymorphisme génétique est décrit pour les protéines de réserve des plantes, aboutissant à la variation des séquences protéiques et à l'apparition d'isoformes qui sont clairement identifiées. Ce phénomène est particulièrement significatif pour l'allergène Ara h 2. En effet, l'allergène Ara h 2 a été initialement caractérisé en électrophorèse monodimensionnelle par deux bandes de 17 kDa et 20 kDa (Burks et al., 1992a). La différence de masse entre les 2 structures est due à l'insertion d'une séquence de 12 acides aminés « QDPDRRDPYSPS » débutant à la position 75 de l'allergène clone Ara h 2.01 pour aboutir au clone Ara h 2.02 (Chatel et al., 2003). L'hétérogénéité déjà observée est accentuée en électrophorèse bidimensionnelle (Burks et al., 1992a). Conformément aux travaux de Burks et al. (1992a), nous avons identifié Ara h 2 dans 4 spots bien distincts, disposés en carré : deux spots de masse moléculaire approximative de 17 kDa et deux autres spots de masse moléculaire de 20 kDa. Les différentes formes se distinguent également deux à deux par le pHi. Une certaine symétrie est ainsi observée. Si la différence de masse s'explique par l'insertion précédemment décrite, la différence de charge pour une même masse moléculaire reste encore à expliquer. Hales et al. (2004) ont publié deux séquences supplémentaires d'allergènes recombinants par rapport aux deux séquences précédentes (Chatel et al., 2003), comportant la substitution en position 142 d'un acide glutamique (E) par un acide aspartique (D) pour Ara h 2.01 et d'un acide aspartique (D) par un acide glutamique (E) pour Ara h 2.02. Aucune différence de charge et donc de pHi ne serait obtenue entre les deux formes. Les différences de masse moléculaire induites par ces substitutions ne permettraient pas une séparation en électrophorèse bidimensionnelle. Il est possible que d'autres modifications puissent expliquer la multitude d'isoformes d'Ara h 2, notamment des modifications post-traductionnelles non analysables par les techniques utilisées.

La multiplicité des spots est également la caractéristique des globulines 11S de l'arachide. Les protéines ou peptides de cette famille constituent la majorité des spots identifiés et, présentent une hétérogénéité de masse moléculaire et de pHi, d'où une grande dispersion sur la surface du gel. Il est à noter que les cartes peptidiques des différents spots sont alignées par rapport à la séquence de Gly1 (gi9864777) et non à celle de l'allergène Ara h 3 (gi2131446/AF510854), présentant 80% d'homologie de séquence. En effet, sur la figure 17, nous pouvons voir que 3 peptides dont les masses ont pu être identifiées par rapport à la séquence de Gly1 présentent une substitution dans la séquence d'Ara h 3 : 233-236 (E pour Gly1/D pour Ara h 3), 131-148 (Q pour Gly1/ gap pour Ara h 3) et peptide 446-468 (Y pour Gly1/F pour Ara h 3). Ces substitutions engendrent des écarts de masse non tolérables pour l'identification de la

protéine. Toutes nos analyses seront donc effectuées par rapport à Gly1, dénommée dans la suite du manuscrit, isoforme d'Ara h 3.

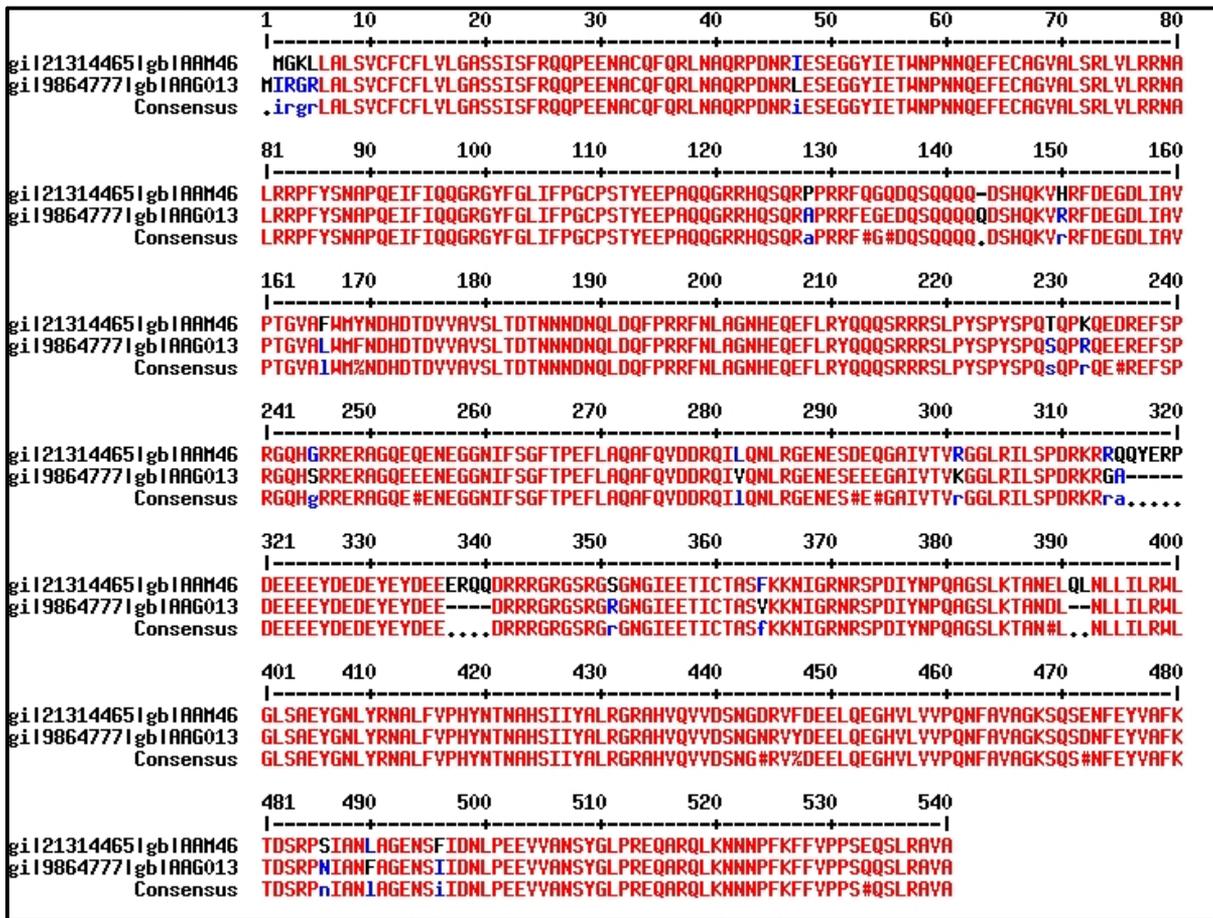


Figure 17 : alignement des séquences protéiques de l'allergène Ara h 3 (gi21324465/AF510854\_1) et de la glycine Gly1 (gi9864777) avec MultiAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Dans le cas des globulines 11S, l'hétérogénéité de la représentation ne s'explique pas essentiellement par des variants de protéines mais plutôt par des phénomènes de dégradations multiples. Il n'a pas été possible d'identifier l'entité entière de l'isoforme d'Ara h 3/Ara h 4 clonée par Kleber-Janke et al. (1999) et Becker et al. (2001) de masse moléculaire 60 kDa et de pHi 5,1. Seuls des fragments de masse moléculaire comprise entre 14 et 45 kDa et de pHi acide ou basique ont pu être caractérisés. Il s'agit des polypeptides classifiés en sous-unités acides et basiques décrits par Koppelman et al. (2003) qui décrivent Ara h 3 comme une protéine hétéro-multimérique de masse moléculaire de 400 kDa dont les sous-unités ont des masses moléculaires de 14 à 45 kDa. Le gène codant pour Ara h 3 donne lieu à la synthèse d'une préprotéine qui est ensuite digérée par des enzymes protéolytiques au cours de sa maturation (Koppelman et al., 2003). Les isoformes d'Ara h 3 appartiennent à la famille des globulines 11S (glycinines) et la présence de sous-unités acides ou basiques peut s'expliquer

par comparaison avec la globuline 11S du soja. La globuline 11S du soja est composée de sous-unités acides de 30 à 36 kDa et de sous-unités basiques de 20 kDa (Staswick et al., 1981) liées de manière covalente par des ponts disulfures en dimères de 55 kDa comportant une sous-unité acide et une sous-unité basique. Ce clivage in situ de l'isoforme d'Ara h 3 est une caractéristique propre aux globulines 11S. Au cours de nos étapes de purification, il faudra tenir compte de la structure multimérique et faire intervenir des agents dénaturants afin de dissocier les complexes. Le procédé protéolytique est un outil d'analyse des épitopes que nous développerons dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

La famille des globulines 7S apparaît, dans l'arachide, plus homogène avec comme représentant, l'allergène Ara h 1 (spot n°1) présent sous la forme d'un spot assez diffus. Ce comportement électrophorétique peut être dû aux glycosylations existantes sur cette structure protéique (Barnett et Howden, 1986) (Burks et al., 1991). Buschmann et al. (1996) ont montré également qu'Ara h 1 consiste en une variété d'isoallergènes de pHi compris entre 4,6 et 8,0 et qu'au moins deux isoformes ont été caractérisées par de légères différences de masse moléculaire.

Notre étude, la plus complète possible, rend compte de la difficulté d'isoler un à un les différents membres de chaque famille pour en déterminer leur immunoréactivité. La stratégie adoptée joue sur des propriétés spécifiques de certaines protéines ou sur les différences de masse, de charge et d'hydrophobicité présentées par l'ensemble des composants de l'arachide.

### **3. Fractionnement, purification et caractérisation des allergènes de l'arachide**

#### **a) Fractionnement au sulfate d'ammonium**

Une étude électrophorétique des différentes fractions, obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium et passage sur Con A-sepharose, a été menée. Les profils diffèrent autant dans leur composition que dans l'intensité relative des différentes bandes mises en évidence (figure 18).

Le culot (figure 18, puits 2), qui représente plus de 75% des protéines fractionnées, se caractérise essentiellement par deux groupes de protéines de masse moléculaire de 40 kDa et 25 kDa qui présentent une coloration intense. D'autres bandes plus mineures, dont notamment une entité vers 66 kDa, sont également observées. Le surnageant (figure 18, puits 3), issu de la précipitation au sulfate d'ammonium, se distingue du culot par une forte représentation des

protéines de masse moléculaire inférieure à 25 kDa, tandis que les groupes à 40 kDa et 25kDa, présente dans le culot, sont ici peu visibles. Nous observons également une forte bande à 66 kDa qui, après passage sur Con A-Sepharose, est atténuée. Parallèlement, l'éluat (figure 18, puits 5) de cette chromatographie d'affinité présente une bande majoritaire correspondant à la fraction à 66 kDa. Le même profil d'épuisement est obtenu pour le culot 40%.

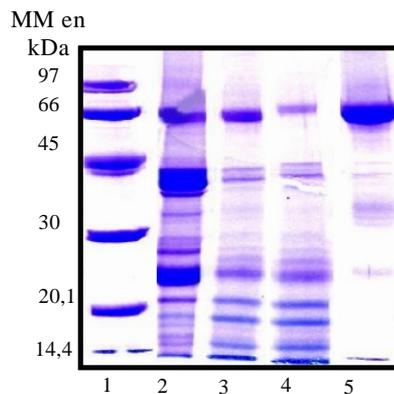


Figure 18 : Electrophorèse SDS PAGE 12% des fractions culot et surnageant issues de la précipitation au sulfate d'ammonium 40% et des fractions issues de la chromatographie d'affinité Con A sepharose. Les marqueurs de taille sont dans le puits (1), le culot 40% en (2), le surnageant 40% avant chromatographie d'affinité en (3), le non retenu de la chromatographie d'affinité en puits (4) et l'éluat de la Con-A Sepharose en (5).

### ***b) Etude des protéines du surnageant 40%***

- Purification en échange d'ion

Nous avons ensuite cherché à mener plus en avant la purification des protéines du surnageant par chromatographie d'échange d'anion. L'éluion sur colonne échangeuse d'anion effectuée sur la fraction surnageant 40% est suivie par mesure d'absorbance à 280 nm (figure 19) et 235 nm (non présentée). Cette première chromatographie a pour objectif de fractionner le mélange en un nombre de groupes protéiques suffisamment restreint pour simplifier les études ultérieures.

Cette expérience a permis de collecter 13 fractions (groupes protéiques) correspondant à des pics ou des épaulements (cas de la fraction F, figure 19).

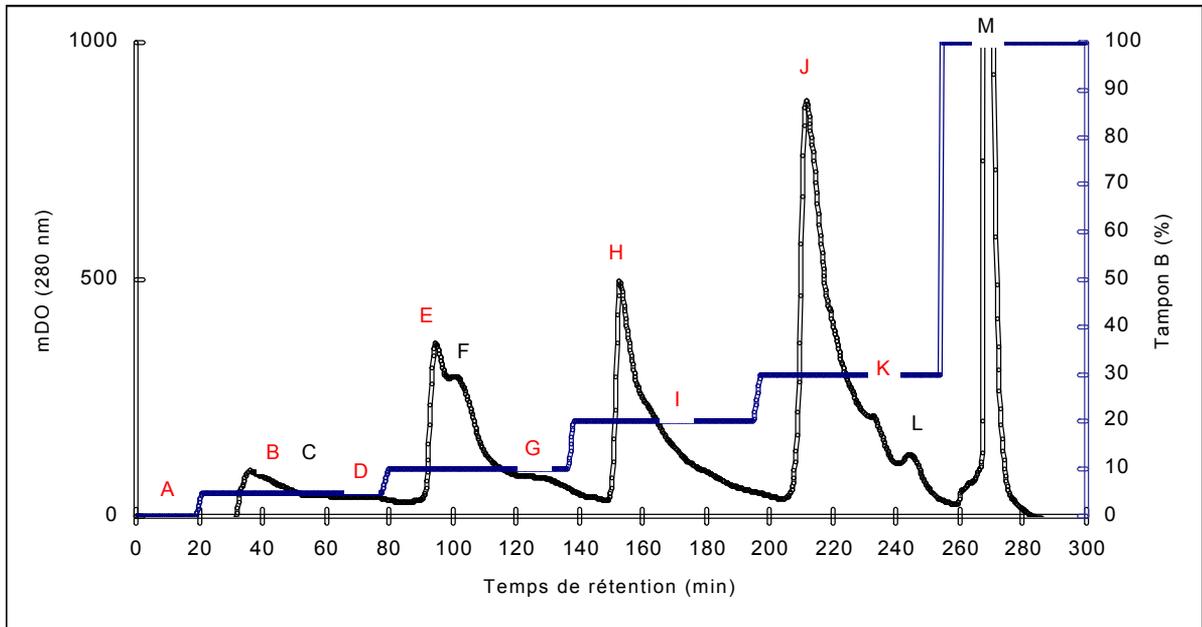


Figure 19 : Chromatogramme de la purification de la fraction surnageant 40% sur colonne échangeuse d'anion Q Sepharose. Le fractionnement est réalisé par suivi de l'absorbance à 280 nm. Le débit utilisé est de  $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

La fraction M, qui absorbe fortement à 280 nm, ne contient pas de protéines et n'a donc pas été retenue pour les analyses ultérieures.

Les analyses électrophorétiques menées sur les différentes fractions A à L ont montré des profils identiques pour certaines de ces fractions, par exemple E avec F. Aussi, les résultats ne seront présentés par la suite que pour des fractions présentant une composition protéique bien différente.

Les fractions A, B, D, E, G et H (correspondant au début de l'élution) sont essentiellement composées de protéines de faible masse moléculaire (entre 14 et 20 kDa) (figure 20).

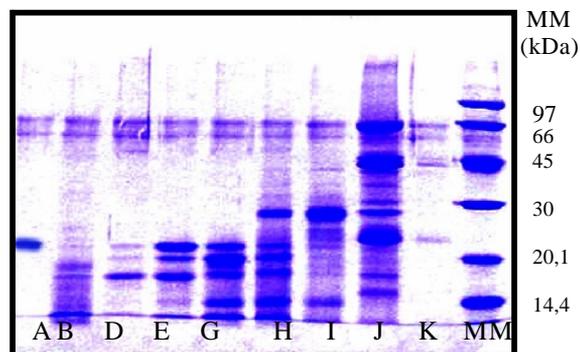


Figure 20 : Profil électrophorétique des fractions issues de la chromatographie d'échange d'anion pour le surnageant 40%. Les échantillons sont déposés à une concentration de  $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  et la révélation des protéines est réalisée par coloration au bleu de Coomassie. Les marqueurs de masse moléculaire apparente sont symbolisés par MM.

Les protéines de masse moléculaire comprise entre 30 kDa et 66 kDa se retrouvent dans les fractions H, I, J, K (figure 20). La fraction J, qui présente un profil électrophorétique proche de celui obtenu avec le culot 40% de la précipitation au sulfate d'ammonium, est écartée. L'étude de ce profil sera détaillée dans la partie « résultats » qui traite de la fraction « culot 40% ». La fraction K est faiblement concentrée ce qui explique la faible intensité des bandes (faible concentration de dépôt).

- Purification en phase inverse

Les fractions A à L, issues de la chromatographie d'échange d'ion du surnageant 40%, ont ensuite été purifiées par chromatographie en phase inverse.

Cette étape de purification est détaillée à titre d'exemple pour le pool E dont le chromatogramme est en figure 21.

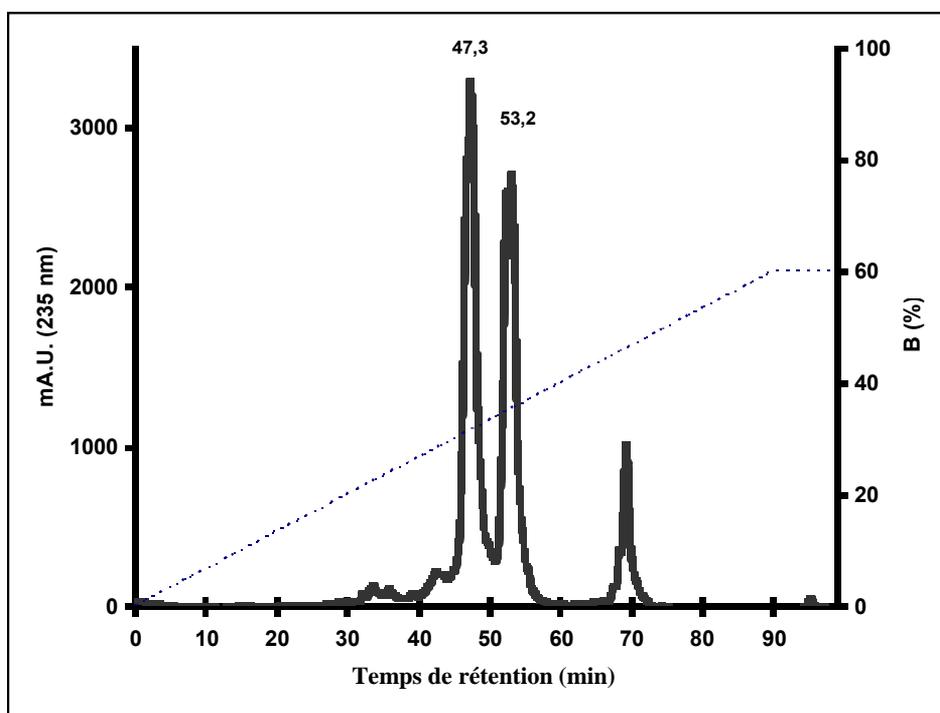


Figure 21 : chromatographie en phase inverse du pool E issu de la chromatographie d'échange d'ion. Le débit est à 8 ml.min<sup>-1</sup>.

Cette chromatographie a permis d'affiner la purification et ainsi d'obtenir trois pics bien résolus à partir d'une seule fraction d'échange d'ion. Le pic de temps de rétention de 69 minutes n'est pas conservé. Nous avons collecté 4 fractions : VI, VII, VIII (pour le pic de

temps de rétention 47'3) et IX (pour le pic de temps de rétention 53,2), la fraction VI, trop peu concentrée, est écartée pour la suite des analyses

Nous avons procédé de même avec toutes les fractions issues de la chromatographie d'échange d'ion et avons ainsi obtenu 15 entités nommées de I à XV. La correspondance entre les fractions de la chromatographie d'échange d'anion et les entités en résultant après la chromatographie en phase inverse est donnée dans le tableau 10.

Tableau 10 : Fractionnement HPLC réalisé à partir des différents groupes protéiques obtenus en chromatographie d'échange d'anion.

Fractions en échange anion	A	D	E	F	H	I (i)
Fractions en phase inverse	I, II	III, IV, V	VI, VII, VIII, IX	X	XI, XII, XIII, XIV	XV

L'image électrophorétique (figure 22) nous permet tout d'abord d'observer des fractions représentées par des bandes uniques ou très majoritaires, à savoir les fractions I (25 kDa), III (10 kDa), IV (18 kDa), IX (18 kDa) et XIV (18 kDa) (figure 22) et la fraction XV (18,4 kDa) (non présentée sur l'électrophorèse de la figure 22). D'autres fractions (VII, VIII, X et XII) présentent un doublet à 18 et 20 kDa. Les dernières fractions (V, XI et XIII) présentent quant à elles plusieurs bandes.

Les résultats électrophorétiques de ces fractions V, XI et XIII sont en désaccord avec les analyses MALDI TOF (non présentées). Il nous est alors paru intéressant de comparer la migration des fractions V, XI et XIII avec ou sans réduction au  $\beta$ -mercaptoéthanol (figure 23). L'image électrophorétique obtenue pour la fraction XI est différente lors de cette électrophorèse. Nous pouvons envisager que les bandes multiples, observées sur la figure 22 pour cette fraction, résultent d'une contamination accidentelle lors du dépôt. La réduction de la fraction V conduit à l'obtention de deux bandes en SDS PAGE (15 kDa et 25 kDa) tandis que l'on retrouve essentiellement une bande à 40 kDa sans réduction. La fraction XIII présente des entités entre 10 kDa et 15 kDa avec réduction et une seule bande vers 14 kDa sans réduction. Les protéines de ces deux fractions pourraient donc présenter des structures polymériques, les ponts disulfures étant dissociés lors de la réduction avec le  $\beta$ -mercaptoéthanol.

Par ailleurs, l'éluat de la chromatographie Con A-Sepharose, dont la purification a été finalisée par une étape chromatographique en phase inverse, présente une bande à 65 kDa et une autre de masse moléculaire d'environ 180 kDa, qui pourrait correspondre à un trimère de l'entité à 65 kDa.

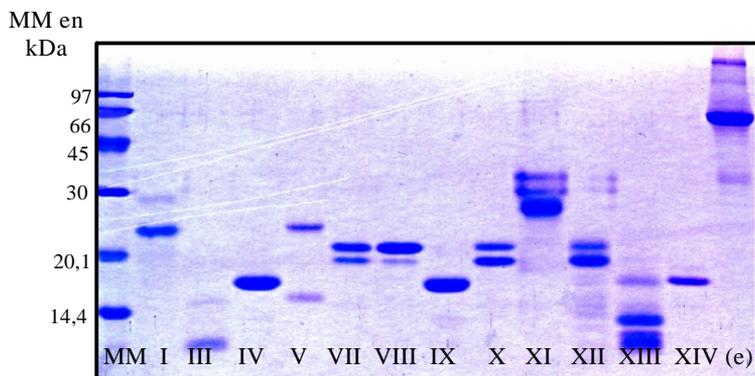


Figure 22 : Profil électrophorétique en conditions réductrices des entités protéiques finales purifiées sur colonne phase inverse. Les échantillons sont déposés à une concentration de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Les différentes bandes protéiques du gel sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. MM : marqueur de poids moléculaire, (e) : éluat de la chromatographie Con A-Sepharose.

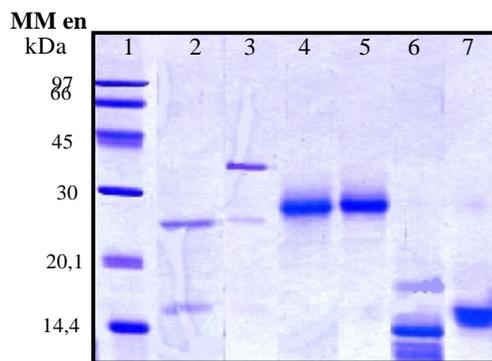


Figure 23 : Profil électrophorétique des fractions V, XI, XIII réduites ou non au  $\beta$ -mercaptoéthanol. De gauche à droite ((r) pour réduit, (nr) pour non réduit) : (1) marqueur de taille, (2) fractions V (r), (3) V (nr), (4) XI (r), (5) XI (nr), (6) XIII (r), (7) XIII (nr).

En conclusion, l'ensemble de ces informations électrophorétiques, chromatographiques ainsi que les analyses en spectrométrie de masse nous ont permis de caractériser les différentes entités isolées et d'estimer leur pureté (tableau 11). Il apparaît de plus que certaines fractions présentent de fortes similarités (fractions XI et XV d'une part et fractions VII, VIII, X, XII d'autre part).

Tableau 11 : masses moléculaires obtenues par spectrométrie de masse MALDI TOF des différentes fractions purifiées sur chromatographie en phase inverse.

Fractions	I	III	IV, IX	V	VII, VIII, X, XII	XI	XIII	XIV	XV	(e)
masses moléculaire en kDa	19 et 23	10,2	14,9	15, 25 et 40	18,2 et 16,7	18,4	14,6	12	18,4	65

### c) Etude des protéines du culot 40%

- Fractionnement par chromatographie d'échange d'ion

Les protéines du culot, épuisées sur colonne d'affinité Con A sepharose (et donc déplétée de la bande à 66 kDa) ont été fractionnées par chromatographie d'échange d'anion. Le profil chromatographique obtenu par le suivi de l'absorbance à 280 nm nous permet de distinguer plusieurs groupes protéiques au sein de cette fraction culot 40%.

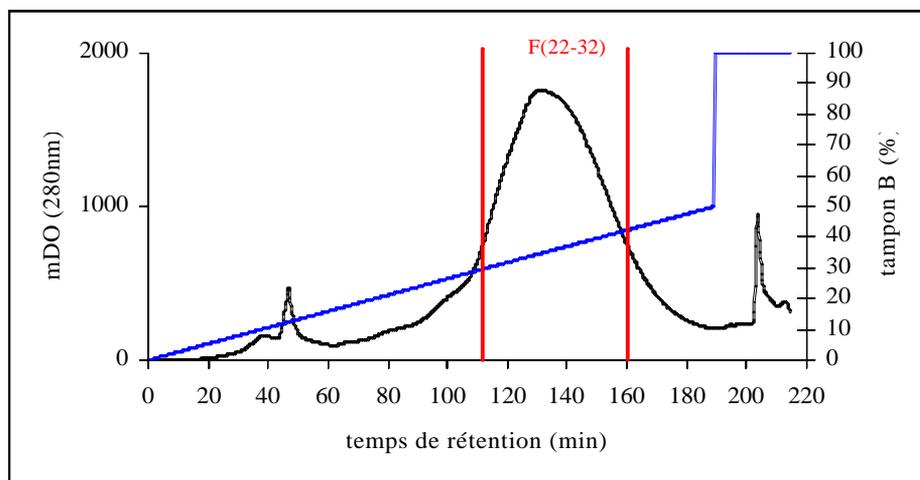


Figure 24 : chromatogramme de la purification de la fraction culot 40% sur colonne d'échange d'anion Q Sepharose. Le fractionnement est réalisé par suivi de l'absorbance à 280 nm. Le débit utilisé est de 8 ml.min<sup>-1</sup>.

Le chromatogramme obtenu lors de la purification des protéines issues du culot 40% sur colonne échange d'anion (figure 24) n'est pas résolutif. Nous avons tout de même réalisé un fractionnement. Seules les fractions 22 (temps de rétention 100 min) à 32 (temps de rétention 160 min), recouvrant le pic principal de ce chromatogramme, ont été conservées et mélangées comme suit : F(22-24), F(25-27) et F(28-32). La composition protéique de chaque mélange de fractions est représentée en figure 25. L'amélioration de la purification de ces entités sera détaillée dans le chapitre suivant.

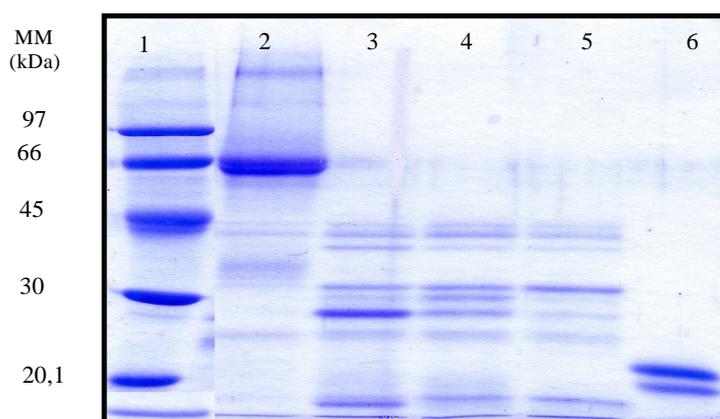


Figure 25: Profil électrophorétique des fractions issues de la chromatographie en échange d'anion pour le culot 40%. Les échantillons sont déposés à une concentration de 200 µg.ml<sup>-1</sup> et la révélation des protéines est réalisée par coloration au bleu de Coomassie. (1) marqueurs de masses moléculaires, (2) éluat Con A sepharose, (3) fractions 22-24, (4) fractions 25-27, (5) fractions 28-32, (6) fraction VII du surn 40%.

Les analyses électrophorétiques (figure 25) menées sur les différentes fractions présentent :

- Des profils homogènes en dépit de comportements chromatographiques différents.

- Une multitude de bandes de masses moléculaires variées, majoritairement comprises entre 25 kDa et 45 kDa. Très peu d'entités présentent une masse moléculaire inférieure à 20 kDa. Aucune des bandes observées n'a un comportement électrophorétique correspondant à l'éluat issu de la chromatographie sur Con A-Sepharose (puits 2) ou à la fraction VII purifiée à partir du surnageant 40% (puits 6) déposés en tant que références.

#### **d) Caractérisation biochimique d'une sélection de protéines**

La caractérisation biochimique a été poursuivie sur une sélection de protéines purifiées par un séquençage des acides aminés amino-terminaux et/ou une identification par analyse protéomique, notamment pour les fragments de globuline 11S, isoforme d'Ara h 3 (tableau 12).

Tableau 12 : caractérisation biochimique des protéines purifiées et retenues pour les analyses de la réponse IgE spécifique par protéomique et séquençage des acides aminés N-terminaux. ND : non déterminé. L'identification des spots du gel 2D est portée en figures 13 et 26.

Spots identifiés sur gel 2D	origine	N°	MM en Da	N-terminal	Identification par protéomique
-	-	-	-	-	Ara Brute
1	Surn40%/culot40%	Eluat ConA	65000	XHPPGERTRGRQP GD	Ara h 1
2-5	Surn40%	VII, VIII, X, XII	16670/18050	RQQWELQGDRRXQSQ	Ara h 2
6 ou 7	Surn40%	IV, IX	14850	MRRERGRQG DSSSIE	Ara h 6
6 ou 7	Surn40%	XIII	14590	MRRERGRQGDS/ STRSSDQQR	Ara h 6 « coupée »
Non attribué	Surn40%	XI	18370	ND	ND
11	Surn40%	V	(15000+25000)= 40000	ND	Fragment de globuline 11S (recouvrement 25-120 + 369-511)
Non attribué	Surn40%	XIV	11950	EEDQSQQQQ DSHQKV	Fragment de globuline 11S (recouvrement 110-207)
8-10, 13, 16-18	Culot40%	I	mélange	ND	Polymère de globuline 11S (recouvrement 25-120+25-208+26-301+197-210+410-511)

Seule une des entités analysées n'a pu, à ce jour, être identifiée (entité XI) par analyse protéomique.

L'éluat de la colonne de Con A-Sepharose, dont la purification a été achevée par HPLC, correspond à l'allergène Ara h 1, une globuline 7S. Les albumines 2S, à savoir Ara h 2 et Ara h 6, sont retrouvées dans de nombreuses fractions, IV, VII à X et XII à XIII. L'entité XIII

présente deux séquences amino-terminales, l'une correspondant à celle de l'Ara h 6 mature, l'autre à une région plus centrale de ce même allergène. L'existence de deux bandes distinctes en électrophorèse dans des conditions dénaturantes, non visibles dans des conditions natives, suggère la présence d'un produit de dégradation d'Ara h 6, dont les fragments sont reliés entre eux par un ou des ponts disulfures. Cette dégradation et cette association sont confirmées par une analyse en spectrométrie de masse MALDI TOF où l'on retrouve une masse de 14,58 kDa, somme des deux masses 5,44 kDa et 9,15 kDa attribuées respectivement aux fragments 21-65 et 68-144, dont les séquences amino-terminales correspondent aux données expérimentales.

Ces phénomènes de dégradation et d'association sont retrouvés pour les entités V, XIV et surtout I issu du culot 40% dont les masses ainsi que les séquences amino-terminales permettent d'identifier comme des fragments de globulines 11S et de les positionner sur la séquence de l'isoforme d'Ara h 3. Cette analyse fera l'objet d'une étude plus approfondie au cours du deuxième chapitre de ce manuscrit.

#### 4. Bilan de la purification

A partir d'un mélange des allergènes que nous avons purifiés précédemment, nous avons réalisés une électrophorèse bidimensionnelle (figure 26).

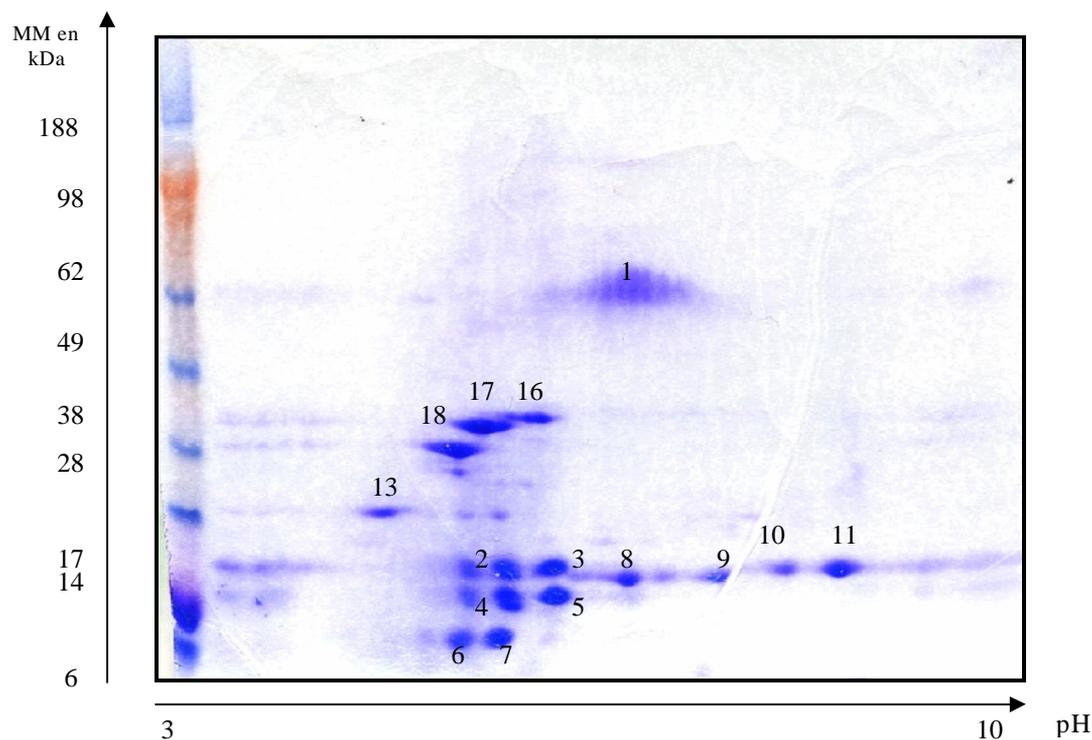


Figure 26 : électrophorèse bidimensionnelle du mélange des protéines purifiées (tableau 6) à partir d'extrait brut d'arachides grillées.

Nous obtenons un nombre assez important de spots correspondant à des entités protéiques bien distinctes. La comparaison du profil bidimensionnel ainsi obtenu, avec celui de l'extrait brut d'arachides grillées (figure 13) souligne que les protéines purifiées puis sélectionnées sont bien représentatives des protéines de l'arachide. Ces entités constituent le répertoire d'allergènes de l'arachide que nous allons étudier par la suite à l'aide de sérums de patients allergiques à l'arachide.

## IV. Conclusion

La purification des différents allergènes de l'arachide a fait l'objet de multiples travaux, chacun étant souvent dédiés à l'isolement d'une seule protéine (Burks et al., 1991) (Burks et al., 1992a) (Koppelman et al., 2003) (Suhr et al., 2004) (Koppelman et al., 2005). Notre approche s'est voulue plus globale.

Basée sur les études de Johns et Jones (1916), Johnson et Naismith (1954) et Barnett et al. (1983) qui séparaient l'arachine de la conarachine, la purification des protéines à partir de l'extrait brut d'arachides grillées a débuté par une précipitation au sulfate d'ammonium. La concentration de sulfate utilisée a permis de séparer les agglomérats de globuline 11S représentant 75% des protéines, des albumines 2S retrouvées essentiellement dans la fraction soluble. De plus, une majorité des globulines 7S qui correspond à Ara h 1 a également été obtenue dans le surnageant de précipitation. Cette simple étape de précipitation au sulfate d'ammonium permettait donc d'écarter les globulines 11S de la majorité des albumines 2S et globulines 7S.

L'utilisation de la chromatographie sur colonne Con A-Sepharose a permis d'isoler spécifiquement l'allergène Ara h 1. La capacité d'une glycoprotéine allergénique de l'arachide (65 kDa et pHi 4,6) à lier la concanavaleine A, avait été décrite par Barnett et Howden (1986). Burks et al. (1991) isolait selon un autre protocole de purification une glycoprotéine répertoriée comme Ara h 1 (masse moléculaire de 63,5 kDa et pHi de 4,55). Par la suite, Buschmann et al. (1996) a établi le lien entre l'allergène purifié par affinité sur Con A sepharose et Ara h 1. Toutefois, la chromatographie d'affinité entraîne la fixation d'entités différentes d'Ara h 1, retrouvées dans le culot de précipitation au sulfate d'ammonium. Ecarter ces contaminants justifie l'étape préalable de précipitation au sulfate d'ammonium. La

chromatographie sur colonne échangeuse d'anion déjà employée pour la purification isolée de différents allergènes de l'arachide (Burks et al., 1991) (Burks et al., 1992a) (de Jong et al., 1998) (Koppelman et al., 2003) a été utilisée en association avec la chromatographie en phase inverse afin de garantir une grande pureté des entités isolées. Ainsi, la combinaison de ces deux systèmes chromatographiques a permis de séparer des protéines présentant des identités proches d'Ara h 2 et d'Ara h 6 (exemple : entités VII, VIII, X et XII). Par contre, les conditions chromatographiques employées ne permettent pas toujours de dissocier les isoformes d'une protéine ou même ses produits de dégradation liés notamment par des ponts disulfures.

Ainsi, Ara h 2 est retrouvé sous forme d'un doublet de masse moléculaire de 16,67 et 18,05 kDa. Ce doublet n'est pas le reflet d'une contamination mais correspond bien à l'hétérogénéité d'Ara h 2 déjà discutée dans le paragraphe A.III.2 (page 24). Burks et al. (1992a) ont attribué deux formes à Ara h 2 ayant pour caractéristiques, des masses moléculaires de 17 kDa et 20 kDa en SDS PAGE et un point isoélectrique à 5,2. Cependant, ces deux entités partagent la même extrémité N-terminale d'acides aminés (séquence déterminée au laboratoire RQQWELQGDR conforme à celle déterminée par Burks et al. (1992a). L'existence de ces deux formes de masse moléculaire différente s'explique par l'insertion d'une séquence « QDPDRDPYSPS ». Par ailleurs, le comportement chromatographique des différentes entités comportant un doublet laisserait conclure à l'existence d'autres isoformes que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

Parmi les protéines purifiées, nous avons pu isoler l'isoforme d'Ara h 6 précédemment observée lors de l'électrophorèse bidimensionnelle de l'arachide brute. Les caractéristiques de migration en SDS PAGE à 16 kDa, le spectre de masse à 14,9 kDa ainsi que la séquence amino-terminale MRRERGRQGDS permettent d'identifier avec certitude cette entité comme Ara h 6 décrit par Kleber-Janke et al. (1999). La carte peptidique confirme son identité correspondant à l'isoforme nommée PSC 33 (gi17225991/AF366561).

De plus, il a été également possible de purifier une isoforme d'Ara h 6 hydrolysée en fragments bien distincts maintenus par des ponts disulfures. Cet allergène est caractérisé par la présence de trois bandes distinctes en électrophorèse en conditions réductrices et d'une bande unique en conditions non réductrices. En parallèle, la spectrométrie de masse révèle, dans des conditions non réductrices, la présence d'une seule entité de 14,6 kDa et dans des conditions réductrices, la présence de sous-unités à 5,44 kDa et 9,15 kDa. Ces caractéristiques ne correspondent à aucun allergène décrit dans la littérature et obtenu par voie biochimique ou

par l'approche de la biologie moléculaire. Le séquençage des acides aminés amino-terminaux a déterminé deux séquences bien distinctes MRRERGRQGDS identique à celle d'Ara h 6 et STRSSDQQR qui correspond à la séquence (68-76) d'Ara h 6 (gi17225991/AF366561). Conforté par l'analyse en spectrométrie de masse MALDI TOF, nous pouvons suggérer l'existence de produits de dégradation de cette isoforme d'Ara h 6. En effet, nous avons purifié un hétéro-dimère d'Ara h 6 hydrolysé. Ce clivage protéolytique est décrit dans la plupart des albumines 2S (Mills et Shewry., 2004). Une petite sous-unité contenant les cystéines 1 et 2 est liée à une sous-unité plus grande contenant les cystéines 3 à 8. Ces deux sous-unités restent associés par les ponts disulfures. La bande de masse moléculaire la plus élevée doit correspondre aux deux sous-unités non dissociées lors de la réduction, et les deux autres bandes à une sous-unité. D'autres produits de dégradation associés à la sous-unité de 9147 Da ont été observés : les peptides 21-62, 23-62 ou 23-65.

Les autres protéines purifiées représentent la famille des globulines 11S, dont les allergènes décrits sont Ara h 3 et Ara h 4 (Kleber-Janke et al., 1999). Nous avons pu seulement isoler des fragments, qui recouvrent la séquence d'Ara h 3, et dont les masses moléculaires varient de 15 kDa à 40 kDa. Koppelman et al. (2003) identifiaient des fragments de 14 kDa à 45 kDa dont le séquençage des acides aminés de l'extrémité amino-terminale a permis le positionnement sur la séquence d'Ara h 3.

Une seule protéine purifiée de masse moléculaire de 18,4 kDa n'a pas pu être identifiée à ce jour.

La purification et l'identification des protéines de l'arachide constituent le premier pas pour la compréhension de l'allergénicité de l'aliment. Il reste à établir l'immunoréactivité de ces entités, à savoir la capacité de liaison avec les IgE de patients allergiques à l'arachide.

La multitude d'isoformes et de produits de dégradation isolés montre bien la complexité protéique de l'arachide. Les fractions purifiées peuvent être regroupées dans les trois familles albumines 2S, globulines 7S et 11S. Pour les études ultérieures et dans un souci de simplicité, nous avons été amenés, dans un premier temps, à sélectionner des protéines purifiées représentatives de ces trois différentes familles et à écarter certaines isoformes ou certains produits de dégradation. Toutefois, comme le montre la comparaison du profil électrophorétique bidimensionnel de l'extrait protéique brut d'arachide avec celui du mélange des allergènes purifiés, le choix des entités permet d'être représentatif de la carte protéique de l'arachide brute initiale.

## **B. REPERTOIRE DES ALLERGENES RESPONSABLES DE LA REPONSE IgE CHEZ DES PATIENTS ALLERGIQUES A L'ARACHIDE**

### **I. Introduction**

Le test de provocation par voie orale est utilisé comme méthode de référence pour le diagnostic de l'allergie alimentaire. Toutefois, du fait des risques encourus par les patients et des contraintes inhérentes à ce test, il n'apparaît pas toujours approprié et prédictif de la symptomatologie réelle du patient. Enfin, il ne rend pas compte de l'implication particulière d'entités au sein de l'aliment. Les études *in vitro*, et notamment, l'analyse de la réponse IgE sont souvent proposées pour palier ces manques et pour se substituer aux tests TPO. Sampson et Ho (1997), Sampson (2001) et Hill et al. (2001) ont montré que la probabilité d'un patient d'être allergique à l'arachide augmente avec les concentrations d'IgE spécifiques. Il est donc possible de diagnostiquer de manière sûre des patients comme allergiques à l'arachide sans test de provocation. Ainsi, Sampson et Ho (1997) estime un seuil de  $15\text{kU.l}^{-1}$ , avec 95% de confiance, au-dessus duquel les patients déclareront des manifestations cliniques lors de l'ingestion de l'aliment. D'autres travaux ont également attesté d'une valeur seuil en IgE spécifiques, prédictive de l'état allergique des patients (Rance et al., 2002). Toutefois, si l'étude de la réponse IgE peut suffire à confirmer une allergie, elle ne permet pas, à ce jour, d'établir un lien direct entre l'intensité de la réponse et la gravité des symptômes du patient puisque les différentes études menées à ce jour font état d'observations divergentes (Hourihane et al., 1997a) (Clarke et al., 1998) (Bernard et al., 2003).

De plus, l'étude de la spécificité de la réponse IgE n'a pas fait l'objet d'une revue détaillée. Nombreux sont les travaux caractérisant les différents allergènes Ara h 1 à Ara h 8 mais aucun d'entre eux ne quantifie la réponse IgE à l'aide d'une représentation la plus exhaustive possible des protéines de l'arachide. Des liens éventuels, suggérés par Hourihane et al. (1997b), entre spécificité et affinité de la réponse IgE et symptomatologie pourraient cependant être établis.

Enfin, l'étude de l'immunoréactivité des protéines de l'arachide et l'analyse de la réponse immune dans une population d'allergiques ne pourraient être complète sans la caractérisation de la réponse des différentes sous classes d'IgG à ces mêmes protéines. Ces différents points

seront abordés dans ce chapitre avec une attention particulière concernant la caractérisation de la réponse IgE associée à l'état allergique du patient. Dans ce cadre, nous proposerons une méthodologie permettant d'affiner nos analyses.

## II. Matériels et méthodes

### 1. sérothèque

L'ensemble de travaux décrits dans ce chapitre repose sur une sérothèque constituée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Evelyne Paty (Service de Pédiatrie Allergologie Pneumologie du Professeur Pierre Scheinmann, Hôpital Necker, Paris). Elle est composée essentiellement de sérums de patients dont l'allergie à l'arachide a été confirmée par des tests cliniques positifs (tests cutanés et tests de provocation orale).

La majorité de nos expériences a été réalisée à l'aide de 80 sérums de patients représentatifs de la sérothèque disponible et sélectionnés sur la base des résultats obtenus lors d'un premier dosage des IgE anti-arachide brute. Toutefois, d'autres sérums de patients autres que ces 80, interviendront lors d'études particulières (EAST inversé et tests cutanés). Les 80 patients choisis correspondent essentiellement à de jeunes enfants (moyenne d'âge inférieure à 7 ans) mais comportent cependant quelques adolescents. La répartition des âges est détaillée dans le tableau 13.

Tableau 13 : répartition des âges en fonction des différentes classes cliniques.

Tranches d'âges (x)	$x < 2$ ans	$2 \leq x < 4$	$4 \leq x < 6$	$6 \leq x < 8$	$8 \leq x < 10$	$10 \leq x$	total
<b>Clinique légère</b>	1	2	7	4	0	4	18
Clinique modérée	0	7	9	6	2	1	25
Clinique sévère	1	1	2	4	7	10	25
Clinique nsp	0	5	6	0	1	0	12
total	2	15	24	14	10	15	80

Les patients sont répartis en fonction de leur symptomatologie selon une classification de Furlong et al. (2001). Les manifestations cliniques, survenant après l'ingestion clairement définie d'arachides, peuvent être de type légère (18 sérums), modérée (25 sérums), ou sévère (25 sérums). Elles peuvent, en l'absence d'informations claires, être peu convaincantes ou survenir après l'ingestion d'aliments sans l'implication isolée de l'arachide et sont appelées dans ce cas de type non spécifiques (nsp) (12 sérums). Les caractéristiques cliniques sont

## Chapitre 1 : Purification et caractérisation des allergènes de l'arachide

détaillées dans le tableau 14 où les sérums utilisés sont classés par ordre croissant, la numérotation indiquée correspondant à la place du sérum dans notre sérothèque.

Tableau 14: description clinique des 80 sérums de patients allergiques à l'arachide utilisés lors des différents tests immunochimiques (DA : Dermatite Atopique, TPO : Test de Provocation Orale, TPL : Test de Provocation Labial, TC : Test Cutané. Les sérums marqués avec (\*) constituent la population d'étude réduite à 40 sérums.

N° sérum	Age (ans)	clinique	symptomatologies	N° sérum	Age (ans)	clinique	symptomatologies
4*	12	sévère	TPO+200mg.	186*	3,5	modérée	DA TC+ TPO+3gr.
10	12	sévère	TPO+100mg.	190*	4	nsp	DA TC+ TPO+1gr.
12	4,5	modérée	TPO+200mg.	194*	5,5	nsp	TPO+3
23	7,5	légère	1°TPO+400mg 2°TPO+3gr.	198	4,5	nsp	DA TC+ TPO+400mg.
39*	6	modérée	crise d'asthme TPO+50mg.(2 tubes)	200	9	sévère.	TPO+100mg.
42	6	légère	TPO+200mg	203	4	sévère	TPO+600mg.
44*	12	sévère	TPO+400mg.	205	9	modérée	TPO+1,5gr.
51*	5	modérée	TPO+400mg.	206	3	modérée	TPO non fait
60*	5,5	modérée		217	5	modérée	TPO+8gr.
62*	6,5	sévère	TPO+100mg.	250	11	légère	urticaire ou vomissements TPO+200mg.
66*	2	sévère	TPO+800mg.	263*	7	sévère	2TPO forts
70	10	sévère		271	3	nsp	DA TC+ TPO-
71*	4	nsp	DA TC+ TPO-	280*	1,5	légère	TPL+
72	6	sévère	TPO arrêté	284*	10	légère	TPO+3,2gr.
81	4	légère		312	5	modérée	TPO+
86	2,5	nsp	TPO-	313*	4	nsp	DA TC+ TPO-
87	8	sévère	TPO+400mg.	315	13	sévère	
93	2,5	modérée		321*	3	modérée	TPO+12gr.
101*	9,5	sévère		330	12	sévère	TPO+100mg.
102*	11	sévère	TPO non fait	366	4,5	nsp	DA TC+ TPO + 1,6gr.
105*	3	légère	TPO+1,6gr.	375	4,5	légère	TPO+
107*	6,5	modérée	TPO+800mg	386	5	modérée	
109*	8	sévère	2TPO forts	388*	5,5	sévère	TPO+200mg.
110*	8	sévère	TPO+200mg.	392	7,5	modérée	TPO NF
115	3	modérée		393	3	légère	TPO+2gr.
123	3	nsp	DA TC+ TPO-	403	4	légère	TPO+800mg.
125*	3,5	modérée	TPO + 800mg	430*	4	légère	TPO+400mg
126	5	sévère	TPO+400mg.	435	5,5	modérée	
127	3	nsp	DA TC+ TPO+800mg	439*	7	sévère	œdème de Q débutant pas de TP
129*	15,5	modérée	TPO+400mg.	440	8	sévère	
134*	1,5	sévère		443*	12,5	sévère	TPO+1,6gr.
135	9	nsp	DA TC+ TPO-	457*	12	légère	
137*	3	nsp	DA TC+ TPO800mg	458*	4,5	légère	œdème lèvres TPO+2gr.
142*	6	modérée	TPO+100mg.	465	6	sévère	TPL+++ urticaire visage conjonctivite
148*	4	légère		470*	4	légère	TPO+6gr.
153	8	modérée	TPO+800mg.	476*	13	légère	TPO+1gr.
154*	7	modéré	TPO+ 800mg	481	6	modérée	TPO+6gr.
177*		modérée		482	6	légère	TPO+1,6gr.
183	8	sévère	2TPO forts	493	4,5	légère	TPO+800mg. Latex
185*	5	modérée	TPO+8gr.	496*	5,5	modérée	TPO+

## 2. Tests immuno-enzymatiques (EAST) avec immobilisation de l'allergène

### a) Principe

- Dosage direct

L'immunoréactivité des différentes protéines purifiées et l'intensité des réponses IgE spécifiques et IgG spécifiques sont analysées à l'aide d'un EAST (Enzyme Allergo Sorbent Test) développé au laboratoire. Cette technique, dont le principe est proche d'un test de type RAST (Radio Allergo Sorbent Test) est basée sur l'utilisation d'allergènes immobilisés sur une phase solide (dans notre cas, une plaque de microtitration 96 puits (Maxisorp, Nunc). Après contact avec le sérum de patient allergique à l'arachide, la présence d'IgE ou d'IgG fixées à l'allergène est révélée à l'aide, respectivement, de l'anticorps monoclonal anti-IgE humaine (BS 17) ou des anticorps monoclonaux anti-sous-classes IgG, marqués à l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme traceur.

L'activité enzymatique fixée sur la phase solide est révélée à l'aide d'une méthode colorimétrique (Ellman et al., 1961). La réaction se traduit par l'apparition d'une coloration jaune dont on mesure l'absorbance à 414 nm. En l'absence d'étalon approprié représentatif des IgE spécifiques, le dosage n'est pas quantitatif et ne permet pas une mesure absolue des concentrations de ces immunoglobulines. Toutefois, une estimation semi-quantitative des IgE spécifiques est effectuée par référence à une gamme d'étalonnage utilisant une phase solide qui contient un anticorps anti-IgE humaine (LE27) complémentaire de l'anticorps traceur BS17 marqué à l'AChE.

Pour des problèmes de standardisation, les réponses IgG ne seront pas quantifiées mais seront exprimées en unité d'absorbance à 414 nm.

- Dosage par compétition.

Les études par compétition reprennent les conditions du test direct, décrit précédemment pour la détermination des IgE spécifiques. Ce test réside dans la capacité d'antigènes en solution à inhiber la liaison d'anticorps spécifiques à un antigène immobilisé sur une phase solide. Les anticorps spécifiques (sérum humain dilué) sont utilisés à une concentration prédéterminée et constante. La présence d'anticorps qui se sont fixés sur la phase solide en dépit de l'incubation avec un compétiteur en solution (dans notre cas, extrait protéique d'arachide), est

révélée de la même façon que pour l'EAST Direct. Dans ce type de dosage, le signal mesuré est inversement proportionnel à la concentration de compétiteur introduite dans le mélange. Les résultats sont exprimés en terme de % de liaison :  $B/B_0$  où  $B_0$  et  $B$  représentent respectivement les IgE spécifiques liées sur la phase solide en absence ou en présence d'une concentration donnée de compétiteur.

La concentration d'anticorps déposée, c'est-à-dire la dilution de sérum, a été déterminée après avoir réalisé une gamme de dilution du sérum concerné envers les protéines d'intérêt, immobilisées sur la plaque de microtitration. La dilution choisie résulte d'un compromis entre :

- D'une part, l'utilisation d'une concentration d'anticorps aussi faible que possible de façon à obtenir un dosage sensible. En effet, le déplacement de la liaison sera alors facilité par le nombre restreint de liaisons à l'antigène immobilisé.
- D'autre part, l'obtention d'un  $B_0$  suffisamment important pour être mesuré avec précision et significativement plus élevé que la liaison non spécifique (liaison mesurée en absence d'anticorps spécifiques). En pratique, on choisit souvent une dilution d'anticorps produisant un signal au moins 10 fois plus élevé que celui de la liaison non spécifique.

### ***b) Préparation des traceurs utilisés lors des différents tests immuno-enzymatiques***

Le marquage enzymatique des antigènes ou des anticorps traceurs est fait avec la forme tétramérique (G4) de l'acétylcholinestérase (AChE) extraite de l'organe électrique d'"*Electrophorus electricus*" (anguille électrique). Les caractéristiques de cette préparation ont été décrites par Grassi et al. (1988) et par Pradelles et al. (1989). La préparation des traceurs, décrite dans les paragraphes suivants, résulte de la réaction de thiols incorporés sur l'antigène ou présents dans l'anticorps avec de l'AChE ayant préalablement réagi avec du SMCC (N-Succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate). Le SMCC est un réactif hétéro-bifonctionnel comportant, d'une part une fonction ester actif réagissant avec les amines primaires de l'enzyme, et d'autre part des fonctions maléimides réactives vis-à-vis des thiols.

- Préparation de l'anticorps traceur BS17-AChE

La préparation de l'anticorps traceur résulte du couplage covalent des fragments Fab', obtenus par protéolyse enzymatique modérée, à l'AChE-SMCC. Ce couplage a été réalisé pour un anticorps anti-IgE humaine, le BS17 (Grassi et al., 1986) utilisé comme anticorps de révélation.

Les anticorps monoclonaux de souris anti-IgE humaines (clone BS17) ont été purifiés et hydrolysés par de la pepsine en milieu acide pour obtenir des fragments F(ab')<sub>2</sub>. La purification des fragments est effectuée par tamisage moléculaire sur colonne ACA 44 (tampon phosphate 0,1M pH 6,0 ; EDTA 5.10<sup>-3</sup>M). Après réduction des F(ab')<sub>2</sub> par de la β-mercaptoéthylamine, les fragments Fab' sont isolés par gel filtration sur colonne Sephadex G-25 (tampon phosphate 0,1M pH 6,0 ; EDTA 5.10<sup>-3</sup>M) puis couplé à l'AChE-SMCC (Grassi et al., 1989). La fonction maléimide peut réagir avec les groupements thiols portés par les fragments d'anticorps. Le couplage entre l'AChE-SMCC et les fragments Fab' doit se faire le plus rapidement possible après l'obtention des thiols, ces derniers pouvant se réoxyder. Un rapport molaire thiols des Fab'/AChE-SMCC de 10 est utilisé. Après réaction pendant 18 h à +4°C, les traceurs sont purifiés par tamisage moléculaire sur colonne Biogel 1.5m (80x1,5 cm) (Biorad) équilibrée en tampon EIA complété par 0,25 M de NaCl. Le profil du traceur est réalisé sur plaques 96 puits par réaction de 10 µl de chaque fraction avec 10 µl de tacrine 0,1 M et 200 µl de réactif Ellman, et lecture à 414 nm.

La tacrine est un inhibiteur de l'activité de l'AChE, et ralentit donc la réaction enzymatique.

Le réactif d'Ellman utilisé au laboratoire correspond à un mélange de 0,75 M d'ATCh et de 0,1 M de DTNB. Ce réactif est préparé, lyophilisé, et conservé à +4°C à l'abri de la lumière afin d'éviter la photolyse du DTNB. Il est reconstitué extemporanément par de l'eau.

Les fractions actives sont alors réunies, et l'activité est mesurée. Les traceurs sont aliquotés et conservés à -20°C.

- Préparation des traceurs anti-IgG<sub>1,2,3,4</sub>

Les traceurs anti-sous-classes IgG (1, 2, 3, 4) sont préparés suivant le même protocole que le traceur anti-IgE humaine (BS17). Les clones utilisés pour les traceurs anti-IgG sont les suivants : anti-IgG<sub>1</sub> (JDC-1, Southern Biotechnology Associates, Inc.), anti-IgG<sub>2</sub> (HP6002, Southern Biotechnology Associates, Inc.), anti-IgG<sub>3</sub> (HP6047, Sigma), anti-IgG<sub>4</sub> (20G/5C7, Biorad international).

### **c) Mode opératoire**

- Tampons utilisés

Le tampon d'immobilisation des protéines sur la phase solide est un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4.

Le tampon de saturation (EIA) des plaques est composé de tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,4 contenant 0,15 M de NaCl, 0,01% de NaN<sub>3</sub> et 0,1% de sérum albumine bovine. Ce tampon est également utilisé pour préparer les dilutions de sérums et des anticorps. Le tampon de lavage des plaques est une solution de 0,01 M de tampon phosphate pH 7,4 contenant 0,05 % de Tween 20. Le lavage des plaques s'effectue avec les laveurs Auto Plate Washer ELx405.

- Préparation des plaques revêtues d'un allergène

Les protéines ou peptides purifiés de l'arachide sont dilués dans du tampon d'immobilisation à raison de 10 µg.ml<sup>-1</sup> et déposés à raison de 100 µl par puits de plaques de microtitration. Après 24 heures à +4°C, les puits contenant les allergènes sont lavés (2 cycles de 3 lavages) et saturés avec le tampon EIA (300 µl par puits) pendant 24 heures à +4°C. Une fois scellées, les plaques peuvent alors être conservées plusieurs mois à +4°C, pour réaliser différents types de tests immunoenzymatiques.

- Détermination des IgE et IgG spécifiques dans les sérums humains

Deux à quatre dilutions (de 1/10 à 1/2000) de chaque sérum sont mises en contact avec les protéines immobilisées pendant 24 h à +4°C (50 µl par puits). Après lavage de la plaque (2 cycles de 3 lavages), l'anticorps monoclonal anti-IgE humaine ou anti-sous-classe IgG marqué à l'AChE est déposé (50 µl par puits, à 2UE.ml<sup>-1</sup>). Après 18 heures de réaction à +4°C, les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages) et 200 µl de réactif Ellman sont déposés dans chaque puits (distributeur Labsystems Multidrop). Des lectures à différents temps (1 h et 2 h) sont alors effectuées à une longueur d'onde de 414 nm (Labsystems Multiskan Bichromatic).

Les valeurs obtenues avec des sérums témoins (patients non allergiques) servent de contrôle négatif.

- dosage par compétition

Les études par compétition reprennent les conditions du test direct, décrit précédemment pour la détermination des IgE spécifiques, avec une étape préalable supplémentaire correspondant à une préincubation de 40 µl de sérum humain dilué avec 40 µl de compétiteur pendant 4 h à température ambiante. Cette étape permet de favoriser l'inhibition de la liaison des IgE à l'allergène immobilisé. Les compétiteurs sont des solutions contenant des concentrations croissantes connues d'extraits protéiques d'arachides ou d'allergènes purifiés. Cinquante microlitres de ce mélange sont mis en contact avec les protéines immobilisées pendant 24 h à +4°C. Les résultats sont exprimés en terme de % de liaison :  $B/B_0$  où  $B_0$  et  $B$  représentent respectivement les IgE spécifiques liées sur la phase solide en absence ou en présence d'une concentration donnée de compétiteur.

### **3. Test immuno-enzymatique avec capture des IgE**

#### **a) Principe de ce dosage**

Depuis le développement des premières détections d'IgE spécifiques du sérum humain (Wide et al., 1967), certaines limitations ont été évoquées et notamment l'interférence des IgG spécifiques. Ce phénomène induit une sous-estimation des IgE spécifiques (Zeiss et al., 1981).

C'est en 1986 que Plebani et al. (1986) ont décrit un nouveau format de dosage pour les IgE spécifiques. Les IgE totales sont capturées par des anticorps anti-IgE humaines immobilisés dans les puits de plaques à microtitration. Les allergènes d'étude sont biotinylés et la révélation est effectuée avec un conjugué avidine-HRP. Cette approche permet d'éviter les interférences avec les IgG spécifiques. Mais les auteurs ont observé une capacité de liaison insuffisante pour les anti-IgE immobilisés sur la phase solide.

En 1993, Olivieri et al. publient une étude sur l'estimation quantitative d'IgE capturées. La méthodologie employée est relativement simple. Les dilutions de sérum sont déposées à raison de 100 µl par puits et l'anticorps traceur (anti-IgE humaine) ou l'allergène marqué sont mis à réagir pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Les auteurs évaluent alors la concentration des IgE avec le RAST et avec leur dosage par capture avant et après épuisement en IgG du sérum. Les résultats de cette étude montrent bien que les interférences par les IgG sont complètement évitées conformément aux travaux de Plebani et al. (1986). La

sensibilité de leur dosage, estimée à  $0,15 \text{ U.ml}^{-1}$ , est 10 fois plus faible que la valeur la plus faible obtenue pour un sérum positif par RAST. Elle est obtenue par des dilutions d'anticorps anti-IgE marqué de 1/1000 à 1/2000 soit 1,2 à  $0,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Cette méthodologie est appliquée à plusieurs types d'allergènes respiratoires et à des petites molécules. Un soin particulier doit être porté au marquage des antigènes, afin d'éviter une modification excessive de la structure antigénique, ce qui peut provoquer une augmentation de la liaison non spécifique de l'allergène sur la plaque.

Ce principe de dosage est approprié pour suivre les IgE spécifiques de sérums de patients avec des allergies déclarées. Le test commercialisé CARLA<sup>®</sup> (Capture Assay Radim Liquid Allergen) (Radim, Italie) s'appuie sur ce principe et est disponible pour un grand nombre d'extrait allergénique et notamment l'arachide. Les résultats de ce test sont corrélés avec ceux d'autres tests d'immuno-analyse comme le CAP system ou Ala-STAT Medical system (Liccardi et al., 2002). Il présente une bonne corrélation entre les différents paramètres notamment un haut degré de sensibilité et de spécificité, mais également une reproductibilité assez importante. Toutes les informations pour ce dosage sont disponibles sur le site du fabricant : <http://www.radim.it/focus/allergologia.html#6>.

Les caractéristiques et avantages espérés de ce type de méthode nous ont amené à développer un test par capture des IgE faisant appel aux différents réactifs antigènes et anticorps précédemment utilisés.

La première étape va donc consister à immobiliser uniquement les IgE de sérum humain à l'aide d'un anticorps anti-IgE humaine, le LE27 (Grassi et al., 1986) adsorbé sur les plaques de microtitration. La présence d'IgE spécifiques liés à la phase solide est révélée à l'aide d'un des allergènes de l'arachide couplé à l'acétylcholinestérase.

### ***b) Préparation des traceurs antigène-AChE***

Avant réaction avec l'AChE-SMCC, l'antigène (dans notre cas, il s'agit d'arachide brute ou des allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 ou fragments de globuline 11S), est traité par un autre réactif hétéro-bifonctionnel, le Succinimidyl-S-acétyl-thioacétate (SATA), réagissant par un ester actif succinimidyl sur les fonctions amines primaires portées par les antigènes et permettant l'incorporation d'une fonction thiol protégée. Cette étape est réalisée en milieu alcalin ou neutre, le SATA étant dissous dans du diméthylformamide (DMF) anhydre.

L'antigène, dilué en tampon borate 0,1 M pH 8,8, est mis en réaction avec un excès de SATA ( $R=SATA/Antigène=5$ ), pendant 30 min à température ambiante. L'excès de SATA est éliminé par tamisage moléculaire sur une colonne Sephadex G25 équilibrée en tampon phosphate 0,1 M pH 6 contenant 5 mM d'EDTA. Les fractions absorbant à 280 nm, correspondant à l'antigène-SATA, sont réunies. A ces fractions sont ajoutés de l'hydroxylamine à une concentration finale de 0,2 M pH 7 pendant 15 minutes à 20°C, permettant la régénération des fonctions thiols à partir de thioester. La concentration en thiols est mesurée par la méthode d'Ellman (Ellman et al., 1961) sur plaque de mirotitration, en mélangeant 100 µl des fractions et 100 µl de DTNB 0,5 mM ( $\epsilon_m=13600$  et trajet optique=0,439 pour un volume de 200 µl). La réaction de couplage est effectuée en employant un rapport molaire SH/AChE-SMCC de 10, sur la nuit à +4°C, avant purification par tamisage moléculaire sur colonne Biogel A 1,5 (80x1,5 cm) équilibrée en tampon EIA complété par 0,25 M de NaCl.

Le profil du traceur est réalisé sur plaques 96 puits par réaction de 10 µl de chaque fraction avec 10 µl de tacrine 0,1 M et 200 µl de réactif Ellman, et lecture à 414 nm.

Les fractions positives sont réunies, et l'activité du pool est mesurée. L'activité de l'AChE est mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman et al. (1961), l'enzyme hydrolysant l'acétylthiocholine en thiocholine qui réduit ensuite le 5,5'-dithio-nitrobenzoate (DTNB). Le DTNB réduit résultant absorbe fortement dans le visible en produisant une coloration jaune. L'activité est exprimée en Unités Ellman par ml ( $UE.ml^{-1}$ ). Une Unité Ellman correspond à la quantité d'enzyme produisant un accroissement d'une unité d'absorbance à 414 nm pendant 1 minute, dans un volume de 1 ml, pour un trajet optique d'un centimètre, à 25°C. Cela correspond à  $7,35.10^{-2}$  unités enzymatiques. Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de substrat pendant une minute à 25°C.

### ***c) Mode opératoire***

- Tampons utilisés

Les tampons utilisés pour ce dosage sont les mêmes que ceux décrits dans le mode opératoire de la partie test immuno-enzymatique de type ELISA page 81.

- Préparation des plaques de capture des IgE humaines

L'anticorps anti-IgE humaine, LE27 (Grassi et al., 1986) est dilué dans du tampon d'immobilisation à raison de  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  et déposé dans les puits de plaques de microtitration ( $100 \mu\text{l}$  par puits). Après 24 h à  $+4^\circ\text{C}$ , les puits contenant l'anticorps sont lavés (2 cycles de 3 lavages) et saturés avec le tampon EIA ( $300 \mu\text{l}$  par puits). Une fois scellées, les plaques peuvent alors être conservées plusieurs mois à  $+4^\circ\text{C}$ , pour réaliser différents types de dosage par compétition.

- Détermination des IgE spécifiques dans le sérum humain

Deux à quatre dilutions ( $100 \mu\text{l}$  par puits dilués de 1/20 à 1/2000) de chaque sérum sont mises en contact avec les anticorps anti-IgE immobilisés pendant 18h à  $+4^\circ\text{C}$ . Après lavage de la plaque (2 cycles de 3 lavages), l'antigène marqué à l'AChE est déposé ( $100 \mu\text{l}$  par puits, à  $2 \text{UE}.\text{ml}^{-1}$ ). Après 4 h de réaction à température ambiante, les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages) et  $200 \mu\text{l}$  de réactif Ellman sont déposés dans chaque puits (distributeur Labsystems Multidrop). Une lecture après 1 h de réaction est alors effectuée à une longueur d'onde de 414 nm (Labsystems Multiskan Bichromatic).

Les valeurs obtenues avec des sérums témoins (patients non allergiques) servent de contrôle négatif.

- Dosage par compétition

Les études par compétition reprennent les conditions du test direct, décrit précédemment pour la détermination des IgE spécifiques avec une modification lors du dépôt de l'antigène traceur afin de réaliser la compétition.

La compétition est réalisée entre l'antigène d'intérêt ( $50 \mu\text{l}$ /puits) et l'antigène traceur marqué à l'AChE ( $50 \mu\text{l}$  par puits à  $2 \text{UE}.\text{ml}^{-1}$ ) incubés simultanément dans les puits présentant les IgE humaines. Les compétiteurs sont des solutions contenant des concentrations croissantes connues d'extraits protéiques d'arachides ou d'allergènes purifiés. La dilution de sérum adéquate à la compétition est déterminée à l'aide des résultats obtenus lors du dosage direct. Les résultats sont exprimés en terme de % de liaison :  $B/B_0$  où  $B_0$  et  $B$  représentent respectivement le signal de liaison du traceur aux IgE en absence ou en présence de compétiteur. Les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison des IgE à Ara h 1 (IC50) peuvent être établies. L'augmentation de la valeur d'IC50 reflète une diminution de la reconnaissance par les IgE.

#### **4. Tests cutanés**

L'analyse de l'immunoréactivité des protéines de l'arachide a été complétée par des tests in vivo de type « prick test ». Les tests cutanés sont réalisés à l'hôpital Necker sous la responsabilité du Dr. E. Paty dans le Service de Pédiatrie Allergologie Pneumologie du Pr. P. Scheinmann.

Les tests cutanés sont réalisés sur l'avant bras des patients en utilisant des extraits bruts ou des extraits d'allergènes purifiés, un contrôle positif (histamine, 10 mg/ml) et un contrôle négatif (solution saline à 50% de glycérol). Vingt microlitres de la solution sont déposés sur la peau des patients qui est ensuite piquée à l'aide d'une aiguille adaptée.

Une réponse au test cutané est positive si le diamètre de la papule est au minimum équivalent à 150% de celui du contrôle positif et de 3 mm. Les réactions dermographiques sont écartées par les tests avec la solution contrôle négatif.

Les extraits sont tout d'abord filtrés à un seuil de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Ils sont ensuite préparés en tampon PBS stérile (Dubelco) et glycérol 50% à une concentration protéique de 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  en accord avec les travaux de Hansen et al. (2001).

### III. Résultats et discussion : vers la corrélation entre le profil de la réponse IgE spécifique et la symptomatologie clinique

#### 1. Profil de la réponse IgE spécifique aux allergènes des différentes familles de protéines végétales

La réponse aux différentes protéines sélectionnées (A.III.3) ainsi qu'à l'extrait d'arachide brute a été déterminée dans notre population de 80 sérums.

La fréquence de réponse (moyenne et médiane) obtenue pour chaque classe clinique est répertoriée dans le tableau 15.

Tableau 15 : valeurs moyenne et médiane des IgE spécifiques, pour les 80 sérums testés et regroupés suivant les 4 classes cliniques (légère, modérée, sévère et nsp), évaluées pour chaque allergène sélectionné.

		réponse IgE spécifique exprimée en UI/ml et fréquence de la réponse (en %)								
clinique		Ara brute	Aa h 1	Ara h 2	Ara h 6	Ara h 6 coupée (XIII)	XI	V globuline 11S	XIV globuline 11S	Culot I globuline 11S
légère	moyenne	105	83	50	72	65	3	58	66	84
	médiane	17	14	10	13	13	0	4	11	14
	fréquence	100	100	88	100	88	22	78	100	100
modérée	moyenne	97	79	62	68	67	3	47	57	83
	médiane	8	6	5	5	4	0	1	3	6
	fréquence	72	70	64	64	70	20	72	80	100
sévere	moyenne	187	140	117	140	136	7	118	129	164
	médiane	170	141	119	118	114	2	95	114	138
	fréquence	100	92	92	92	92	60	92	92	100
nsp	moyenne	42	33	25	27	26	1	19	23	35
	médiane	12	11	9	10	9	0	4	7	10
	fréquence	100	67	67	67	67	17	67	67	75

Il faut tout d'abord souligner que chacune des protéines testées est reconnue par les IgE de patients allergiques. De plus, quelque soit la protéine testée ou la classe clinique étudiée, les fréquences de réponse sont presque systématiquement supérieures à 60%. Les seules exceptions sont observées avec la protéine de masse moléculaire 18370 Da (XI) qui engendre une reconnaissance par les IgE assez faible, particulièrement dans les groupes de cliniques « légères », « modérées » et « nsp » avec des fréquences inférieures à 25%. Pour cette protéine, la fréquence de reconnaissance est la plus importante dans le groupe « sévère ». Ce groupe présente par ailleurs un pourcentage de réponse positive supérieur à 90% pour toutes

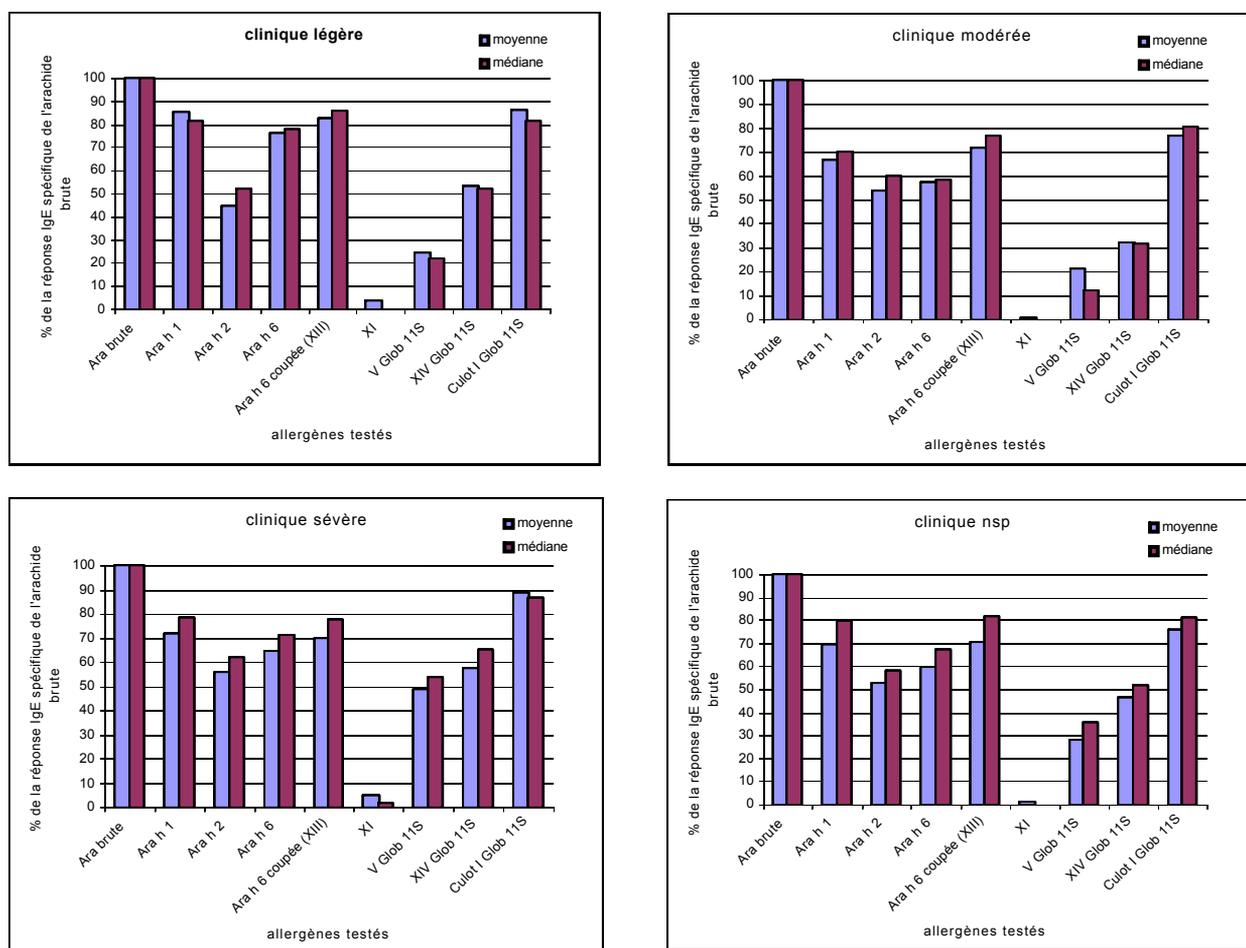
les autres protéines testées. Il est aussi intéressant d'observer que les fréquences de réponse estimées ne permettent pas de distinguer les différents groupes cliniques. Les fréquences de réponse pour chaque protéine sont notamment très proches entre les groupes de clinique « légère » et « sévère ».

Ce manque de distinction entre les groupes s'explique essentiellement par notre choix de sérums basé sur une première étude de la réponse IgE spécifique à l'arachide brute. En effet, nous n'avons pas cherché à avoir des populations homogènes dans chaque groupe mais, au contraire, nous avons sélectionné des patients pouvant présenter des réponses IgE atypiques, ne correspondant pas forcément à leurs symptomatologies. Par exemple, les sérums 23, 42 et 470 montrent à l'origine une symptomatologie légère mais présentent des réponses IgE à l'arachide brute élevées. Une autre étude menée au laboratoire a montré que l'incorporation de nombreux autres patients dans le groupe de clinique légère faisait chuter la fréquence de réponse positive.

Une seconde caractéristique de la population concerne le groupe de clinique « nsp » à effectif réduit qui est composé de patients pouvant présenter des allergies sévères mais dont la réactivité à l'arachide n'était pas prouvée. Les patients de clinique « nsp » pourraient être notamment inclus dans le groupe de clinique sévère.

En dépit de ces biais potentiels, nous pouvons tout de même remarquer des différences importantes entre les groupes en terme d'intensité de réponse. Les moyennes de réponse IgE spécifiques les plus fortes sont observées dans le groupe « sévère ». Les différences sont accentuées lorsque nous comparons les médianes qui sont souvent 10 fois plus fortes pour le groupe « sévère » par rapport aux groupes « léger » ou « modéré ». Ces écarts de médiane entre les groupes sont conservés pour les protéines de la famille des albumines 2S, des globulines 7S et 11S. Aucune protéine n'engendre une réponse particulière, orientée vers un groupe de symptomatologie.

Cette dernière observation est retrouvée en figure 27 lorsque la réponse IgE spécifiques aux protéines purifiées est exprimée en pourcentage de celle obtenue contre l'arachide brute. Nous avons décidé d'exprimer ainsi la réponse IgE spécifique afin de mieux traduire la spécificité des IgE aux différentes protéines.



**Figure 27: immunoréactivité des allergènes purifiés exprimés en % de la réponse IgE spécifique de l'arachide brute. Moyenne et médiane réalisées sur 80 sérums. Glob 11S : globulines 11S**

Les réponses IgE spécifiques (moyenne et médiane) aux protéines sont systématiquement inférieures à celles mesurées avec l'arachide brute.

Les réponses IgE spécifiques anti-Ara h 1 et anti-isoforme d'Ara h 6 sont très proches. A titre d'exemple, elles représentent 75 à 83% de l'intensité de réponse à l'arachide brute pour le groupe de clinique « légère ».

La réponse IgE spécifique anti-Ara h 2 apparaît inférieure à celle anti-Ara h 1 ou anti-isoformes d'Ara h 6, et ce phénomène est particulièrement observé pour le groupe de clinique « légère ».

Les réponses les plus faibles sont observées avec la protéine de 18370 Da (XI), non identifiée à ce jour.

Le profil de réponse IgE aux différentes protéines est sensiblement conservé pour les quatre classes cliniques et, par conséquent, aucune spécificité significative, liée à la symptomatologie, n'est décelable. Seules les réponses IgE aux fragments de globulines 11S

semblent varier selon les groupes. L'intensité de réponse IgE spécifique (en moyenne) au fragment V correspond à 50% de la réponse à l'arachide brute dans le groupe « sévère » et est diminuée de moitié dans les groupes de clinique « légère » et « modérée ».

- Conclusion

Cette première analyse de la réactivité IgE d'allergènes des différentes familles de protéines de l'arachide a montré que toutes les protéines exceptées une (non identifiée à ce jour), sont reconnues par plus de 60% des patients quelque soit la classe clinique observée. L'étude de Kleber-Janke et al. (1999) a montré une fréquence de reconnaissance des allergènes recombinants de 65% pour Ara h 1, 85% pour Ara h 2, 53% pour Ara h 4, 38% pour Ara h 6 et 43% pour Ara h 7 par les sérums de 40 patients allergiques à l'arachide et quatorze profils d'affinité différenciés parmi tous ceux réalisés. Par notre approche biochimique, nous observons des différences de comportement en terme de fréquence de réponse par rapport à la description faite par Kleber-Janke et al. (1999). Dans notre étude, l'isoforme d'Ara h 6 peut être décrite comme un allergène majeur car plus de 90% des sérums de notre étude réagissent. Or, Kleber Janke et al. (1999) n'obtenaient, avec l'allergène cloné, que 38% de fréquence de réponse. Très récemment, Suhr et al. (2004) ont purifié l'allergène Ara h 6 et décrivent une reconnaissance par plus de 90% des sérums testés, ce qui leur permet également de le définir comme un allergène majeur. Les différences observées peuvent être dues d'une part aux différents systèmes utilisés, l'allergène étudié par immunoblot étant dans une conformation plus dénaturée que dans les tests immuno-enzymatiques de type EAST, et d'autre part à des réactifs différents, notamment les allergènes recombinants qui ne possèdent pas les modifications post-traductionnelles des protéines végétales naturelles ou dont la structure n'est pas identique à la protéine naturelle.

Dans notre étude, les IgE de tous les sérums reconnaissent plus d'une seule protéine de l'arachide. Koppelman et al. (2004) ont observé de même que les patients qui présentaient une réponse IgE spécifique contre Ara h 3, reconnaissaient Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6 dans la majorité des cas. Nos résultats permettent d'observer que la réactivité anti-Ara h 2 et celle anti-Ara h 6 sont les plus prononcées. Cette observation a été évoquée par Koppelman et al. (2004) et Koppelman et al. (2005). Ces analyses permettent de souligner d'une part le phénomène de polysensibilisation observé pour l'allergie à l'arachide et d'autre part la proportion importante des albumines 2S, et particulièrement Ara h 6, dans l'immunoréactivité de l'arachide.

La protéine glycosylée présentant une bande à environ 66 kDa en SDS PAGE et purifiée par chromatographie d'affinité est fortement reconnue par les IgE des sérums testés. Cette entité a été identifiée par Burks et al. (1991) et répertoriée comme Ara h 1 après avoir été précédemment décrit par Barnett et Howden (1986). Dans les deux études, Ara h 1 était présenté comme un allergène majeur avec une intensité de réponse importante ce qui est conforme à nos résultats. L'allergène Ara h 2, décrit comme allergène majeur par Burks et al. (1992a), est également reconnu par plus de 90% des patients allergiques à l'arachide testés dans notre étude.

Nous avons également observé que l'isoforme d'Ara h 6 représente 55% à 85% de la réponse IgE spécifique de l'arachide grillée. Suhr et al. (2004) ont montré par des tests de libération de médiateur des basophiles qu'Ara h 6 est un allergène pertinent d'un point de vue clinique et représentant 59,2% à 72% de l'activité allergénique de l'extrait d'arachide crue. Cependant, les auteurs n'ont pas pu établir de relation d'intensité de réponse entre la réponse IgE spécifique anti-Ara h 2 et celle anti-Ara h 6, deux albumines 2S présentant pourtant 59% d'identité. Dans nos expériences, la réponse IgE spécifique anti-Ara h 6 est toujours en accord avec la réponse IgE anti-Ara h 2. Lors de la préparation de ce manuscrit, Koppelman et al. (2005) ont montré qu'Ara h 6 présente une homologie avec Ara h 2, et particulièrement au niveau des parties centrale et carboxy-terminale de la protéine. L'inhibition de la liaison Ara h 6-IgE par Ara h 2 souligne la réactivité croisée de certains épitopes d'Ara h 6 avec certains épitopes d'Ara h 2. Les discordances de résultats d'immunoréactivité observées sont d'une part dues aux différences entre les populations d'étude (âge, clinique, sensibilisation...) et d'autre part à la nature même de l'isoforme d'Ara h 6 purifiée et étudiée. En effet, les isoformes d'Ara h 6 ont très peu de différence structurelle, seules quelques substitutions en acides aminés modifient la structure primaire de la protéine. Le nombre de cystéine et leur position sont toujours conservés d'où une conformation peu modifiée. Les méthodes de purification sont légèrement différentes d'une étude à l'autre ce qui peut jouer sur la présentation de l'allergène aux IgE spécifiques.

Les autres différentes entités correspondent toutes à des fragments de la protéine Gly1, isoforme de l'allergène Ara h 3 (Boldt et al., 2005). Via nos différentes méthodes immuno-analytiques, nous avons vérifié l'immunoréactivité de Gly1. Ces fragments présentent une fréquence de réponse de 90% et une intensité de réponse plus faible que les autres allergènes de l'arachide que nous avons précédemment décrits. Seule l'entité 9 (culot I globuline 11S) qui recouvre une très grande partie de l'isoforme d'Ara h 3 présente une intensité de réponse proche de celle d'Ara h 1. L'entité 7 qui se présente comme l'association de deux sous-unités

de 15 kDa et 25 kDa est reconnue par plus de 90% de la population d'étude en EAST. Mais, l'expérience d'immuno-empreinte conduit à l'atténuation de ce signal. La perte de polymérisation et le changement de conformation induits lors de l'électrophorèse doit interférer avec la reconnaissance par les IgE. Quand à l'entité 6 (XI), aucune réponse IgE spécifique n'est observée en immuno-empreinte et en EAST direct. L'isoforme d'Ara h 3 est décrit à partir de l'allergène recombinant comme un allergène mineur puisque seulement 53% (Kleber-Janke et al., 1999) et 44% (Rabjohn et al., 1999) des patients reconnaissent cet allergène. Nos résultats ne sont pas en adéquation puisque la fréquence de reconnaissance (>90%) en fait un allergène majeur. Cette différence peut être expliquée par des différences dans les populations d'étude ou par des différences dans les caractéristiques biochimiques de l'isoforme d'Ara h 3 recombinant comparé à son équivalent purifié à partir de l'arachide. Quoiqu'il en soit, Koppelman et al., (2003) ont isolé l'allergène ou plutôt les fragments d'Ara h 3 et n'observent que 35% de leur population réactive à Ara h 3 en immuno-empreinte. La discordance observée entre nos résultats et ceux de Koppelman et al. (2003) peut là encore être une conséquence de la différence de population mais également à la technique d'immuno-analyse employée différente de la nôtre : immuno-empreinte vs EAST. Les contraintes imposées lors de l'immuno-empreinte peuvent interférer dans la reconnaissance de l'allergène par les IgE de patients allergiques. L'étude de la reconnaissance des différents fragments de l'isoforme d'Ara h 3 par les IgE de patients allergiques fera l'objet du deuxième chapitre au cours duquel nous analyserons la répartition épitopique des allergènes de l'arachide.

Les allergènes caractérisés par ces travaux sont relativement nombreux et ne sont pas spécifiques d'un sérum donné. L'allergénicité de l'arachide ne semble pas être majoritairement due aux allergènes Ara h 1 et Ara h 2. En effet, notre étude montre notamment qu'Ara h 6, présentent une immunoréactivité tout aussi importante. L'obtention des fragments d'isoforme d'Ara h 3 permet de compléter l'analyse de la réponse IgE.

Aucune spécificité de la réponse IgE ne semble réellement se détacher parmi notre population d'étude. L'établissement d'une réelle corrélation entre le profil de réponse et la clinique du patient allergique n'a pas pu être possible par cette approche, ce qui souligne la complexité du problème de l'allergie à l'arachide. Néanmoins, nous avons pu montrer que l'intensité de la réponse IgE spécifique est significativement plus importante pour les patients de clinique « sévère ».

Nous avons décidé d'approfondir l'étude de l'immunoréactivité des allergènes de l'arachide par l'étude de la réponse des sous-classes IgG contre l'extrait d'arachide brute.

## 2. Etude de la réponse IgG

Nous avons étudié le profil de réponse des sous-classes des IgG (1, 2, 3, 4) contre de l'arachide brute immobilisée (figure 28) sur la même population de sérums. Les 4 premiers graphes représentent la réponse exprimée en unité d'absorbance (414 nm) respectivement pour les IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> et IgG<sub>4</sub>, les sérums étant dilués au 1/200. Le dernier graphe présente la réponse IgE exprimée en unité d'absorbance (414 nm) pour une dilution 1/20 des sérums. L'emploi d'une plus forte dilution pour mesurer les IgG par rapport aux IgE résulte de la grande différence de concentration des IgE présentes en quantité infime dans le sérum par rapport aux IgG (75 à 80% des Ig totales).

L'étude de la réponse sous-classe IgG à l'arachide brute montre une forte hétérogénéité et ce, quelque soit la sous-classe étudiée.

Les signaux IgG<sub>2</sub> ou IgG<sub>3</sub> apparaissent relativement faibles sauf pour quelques sérums dans les groupes de clinique « modérée » et « légère », par exemple les sérums 39, 51, 312, 496, 42, 81, 403 et 470.

Pour les sous-classes IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>4</sub>, il apparaît difficile de distinguer un groupe clinique, l'intensité de réponse étant également répartie entre clinique « légère », « modérée » et « sévère ». En effet, contrairement aux IgE, l'intensité de la réponse IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>4</sub> spécifiques n'est pas significativement liée à un groupe de symptomatologie. Cette observation est appuyée par le test statistique de la somme des rangs de Mann Whitney (SigmaStat 3.0) qui ne détermine aucune différence significative entre les différentes classes cliniques.

La complexité de la réponse sous-classe IgG peut être encore soulignée par l'absence de corrélations fortes entre les sous-classes IgG ou classe IgE d'anticorps. Les corrélations les plus élevées sont obtenues entre les réponses IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>4</sub> d'une part (0,73) et entre les réponses IgG<sub>1</sub> et IgE d'autre part (0,68).

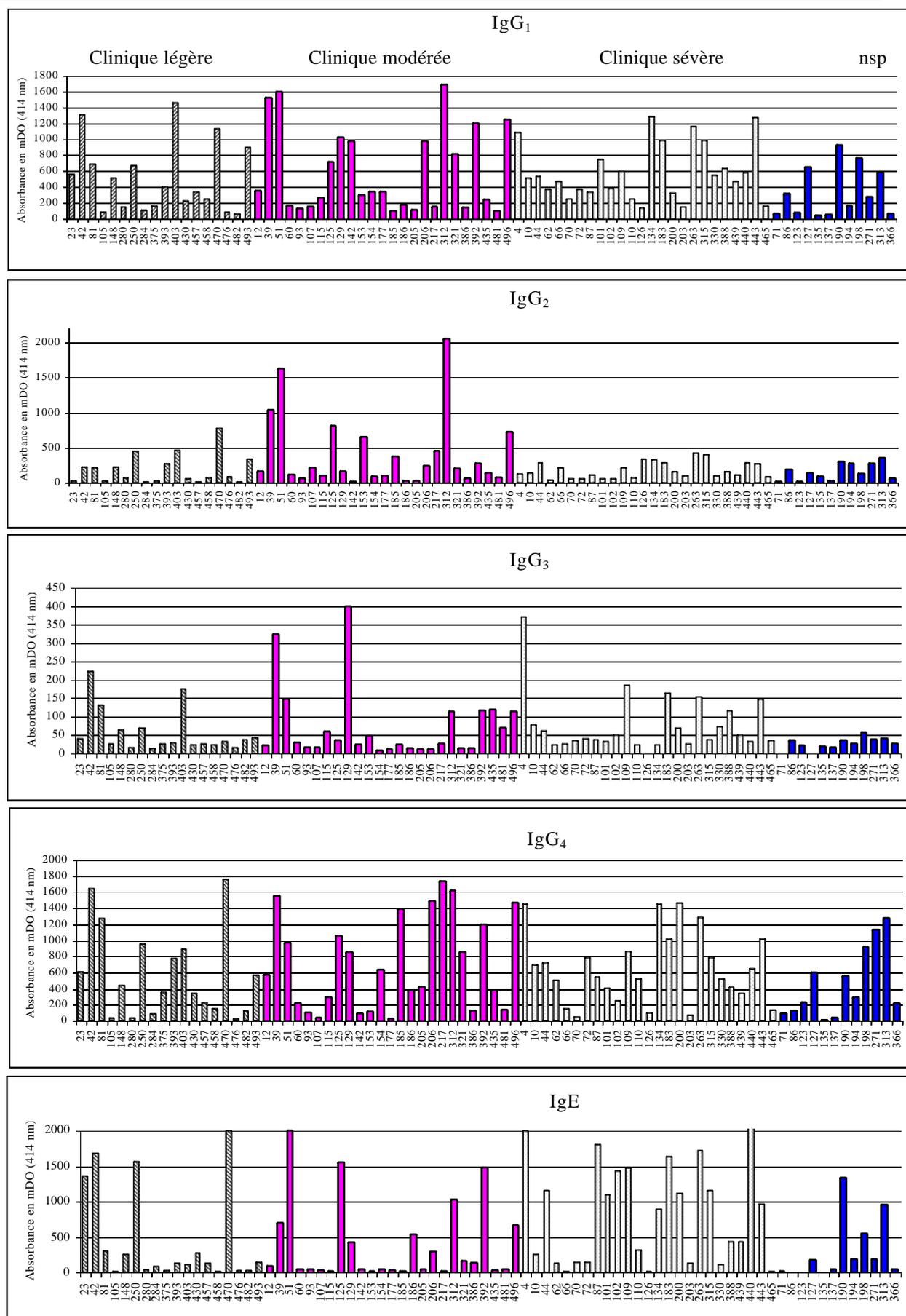


Figure 28 : profil de la réponse des sous classes des IgG (1, 2, 3, 4) et des IgE contre de l'arachide brute immobilisée pour les différents groupes cliniques des patients. Les sérums sont dilués au 1/200 pour les sous-classes d'IgG et au 1/20 pour les IgE.

L'ensemble de ces résultats ne permet pas toujours d'établir un lien clair entre l'intensité de la réponse des sous-classes IgG et la symptomatologie. Nous avons alors voulu vérifier que les réponses sous-classes IgG aux allergènes purifiés avaient le même profil que celles à l'arachide brute. Nous avons donc étudié la spécificité de la réponse sous-classe IgG aux différentes protéines immobilisées, à savoir Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6, les globulines 11S et la protéine XI de MM de 18,4 kDa peu ou pas reconnue par les IgE. Pour cela, 15 sérums de patients ont été sélectionnés ainsi que 3 sérums témoins issus de patients non allergiques à l'arachide (figure 29). Une autre représentation graphique, par allergène, est proposée en annexe III.

Les résultats observés pour l'arachide brute sont retrouvés pour chacune des protéines testées. Pour chaque sous-classe, les profils de réponse sont assez variables au sein d'une même classe clinique, aucune classe ne semblant présenter une réponse IgG particulière à l'une des protéines.

Par contre, dans le cas des IgG<sub>1</sub>, les protéines Ara h 2 et Ara h 6 mais aussi Ara h 1 semblent moins bien reconnues que les fragments de globulines 11S (culot I). Ce phénomène propre aux IgG<sub>1</sub> n'est pas retrouvée dans le profil de réponse IgG<sub>4</sub> et ne semble pas dépendre d'une classe clinique. Seule la protéine XI (ou entité 6) (cf tableau 12 page 70) n'est pas ou peu reconnue par les IgE mais également les sous-classes d'IgG. Quelques sérums de clinique « modérée », « nsp » et « sévère » présentent une réponse IgG<sub>3</sub> contre le polymère de fragments d'Ara h 3. Pour le sérum 39, nous pouvons observer une réponse sous-classe IgG spécifique contre l'entité culot I (fragments d'Ara h 3). De même, trois sérums (148, 321, 457) présentent une réponse IgG<sub>2</sub> plus importante contre Ara h 2 et Ara h 6 mais cette réponse est identique pour le sérum témoin W. Il n'est donc pas possible de conclure à un lien entre ces réponses et la clinique.

# Chapitre 1 : Purification et caractérisation des allergènes de l'arachide

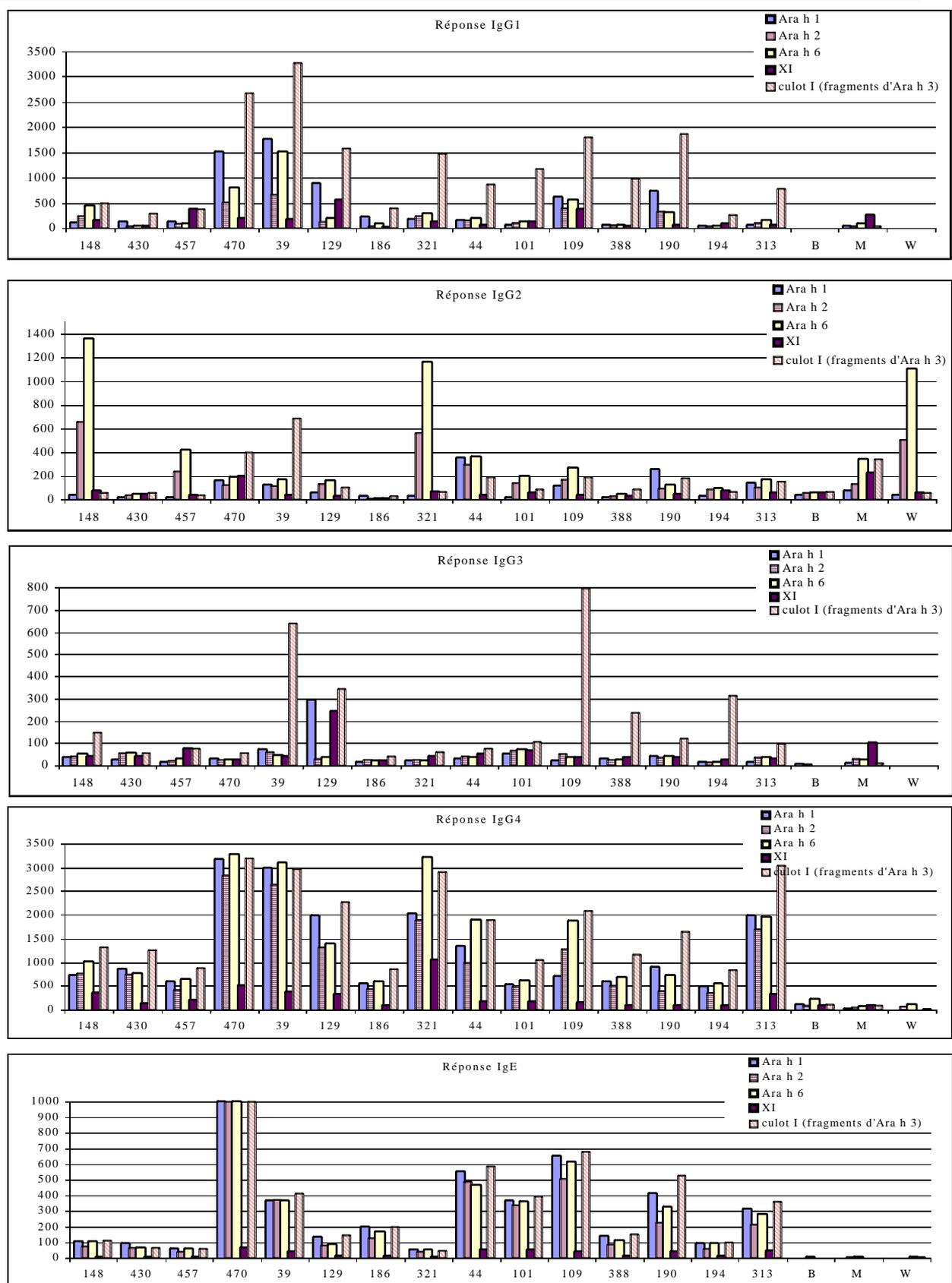


Figure 29 : profil de la réponse des sous classes des IgG (1, 2, 3, 4) et des IgE contre les allergènes majeurs de l'arachide pour les différentes classes cliniques des patients. Les sérums sont dilués au 1/200 pour les sous-classes d'IgG et au 1/20 pour les IgE. Les sérums B, M, W sont des sérums d'individus non allergiques.

- Conclusion

Notre étude montre essentiellement que les réponses IgG aux allergènes de l'arachide testés sont préférentiellement restreintes aux sous-classes IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>4</sub>, ce qui reste identique aux travaux de Lessof et al. (1991) et Husby et al. (1989). Par contre, nos résultats n'ont pas permis de corréler le profil de réponse des sous-classes IgG, aussi bien contre l'arachide brute que contre ses différents allergènes, à la classe clinique du patient. Néanmoins, nous avons pu observer particulièrement pour les albumines 2S, à savoir Ara h 2 et Ara h 6, que la réponse IgG<sub>1</sub> reste faible, alors que les réponses IgE et IgG<sub>4</sub> sont importantes. Ce phénomène qui reste spécifiquement lié à cette famille particulière d'allergènes, de faible masse moléculaire, laisse suggérer un mécanisme d'induction, de régulation ou de polarisation différent des autres familles d'allergènes de l'arachide.

Il est important de souligner la difficulté d'attribuer un rôle physiologique clair aux IgG. En effet, en dépit de nos nombreux travaux, nous n'observons pas de corrélation entre la symptomatologie et l'intensité de réponse IgG à l'arachide brute et aux allergènes. Les résultats que nous avons obtenus pour l'étude de la réponse des sous-classes IgG contre l'arachide brute sont conformes aux travaux obtenus par de Jong et al. (1998). Ils observent des profils de liaison d'IgE et d'IgG aux protéines de l'arachide similaires par des techniques d'immuno-empreinte utilisant des pools de sérums de patients allergiques à l'arachide. Szabo et Eigenmann (2000), avec des sérums individuels de patients montrent que les profils de liaison des IgG totales et plus précisément des IgG<sub>4</sub> aux fractions d'arachide sont identiques aux IgE. La spécificité de réponse des IgE et des IgG à des fractions similaires pour des patients allergiques à l'arachide suggère un déclenchement de la sécrétion spécifique antigénique commun pour les 2 isotypes. De plus, de nombreux patients avec une réponse IgG spécifique présentaient notamment une réponse IgG<sub>4</sub> spécifique, ce qui confirme que le mécanisme de commutation d'anticorps séquentiel en IgE inclut les IgG<sub>4</sub>. Mais, certains auteurs, tels que Jeannin et al. (1998) et de Boer et al. (1998), soulignent que les IgG<sub>4</sub> pourraient tenir le rôle d'anticorps bloquant la production d'IgE, notamment au cours des traitements d'immunothérapies spécifiques (Jakobsen et al., 2005).

Pour approfondir l'étude du profil de réponse à l'arachide brute et aux allergènes purifiés, nous avons décidé d'évaluer un format de dosage différent du format par immobilisation des protéines.

### **3. Analyse de la réponse IgE à l'aide de la détection par capture des IgE**

Dans notre protocole de dosage des IgE par immobilisation des protéines, nous utilisons des sérums de patients sachant que les IgG, fortement concentrées dans le sérum, peuvent reconnaître les mêmes épitopes que les IgE. Les IgG peuvent alors interférer dans la liaison IgE spécifiques-allergènes, et ainsi diminuer la sensibilité du dosage. Le dosage par capture des IgE permettra de contourner le problème.

#### ***a) Fonctionnalité du dosage par capture***

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier la fonctionnalité du dosage dans des conditions assez particulières, avec des sérums atypiques en terme de réponse IgE dans le premier système. Un principe important du dosage repose sur l'étape de lavage introduite après l'incubation du sérum et avant l'addition du traceur allergène marqué à l'AChE. Cette procédure séquentielle doit éviter les interactions IgG spécifiques/allergène-AChE et ainsi seules les IgE spécifiques pourront se lier à l'allergène-AChE.

Nous avons réalisé des courbes de dilutions avec 4 sérums (37, 276, 41 et 105) sur les deux formats de dosage : le premier pour lequel l'arachide brute est immobilisée et le deuxième pour lequel l'arachide brute est marquée à l'AChE. Les courbes ainsi obtenues sont représentées en figure 30.

Pour les quatre sérums testés, de classe clinique variée, nous pouvons observer une différence de réponse pour une même dilution entre les deux formats. Le format de dosage par capture des IgE permet d'obtenir un signal plus important et plus spécifique puisque le rapport signal spécifique/signal non spécifique est plus fort y compris à des dilutions importantes. Il est donc possible d'obtenir une meilleure sensibilité pour ces quatre sérums de clinique « légère », « modérée » ou « nsp ».

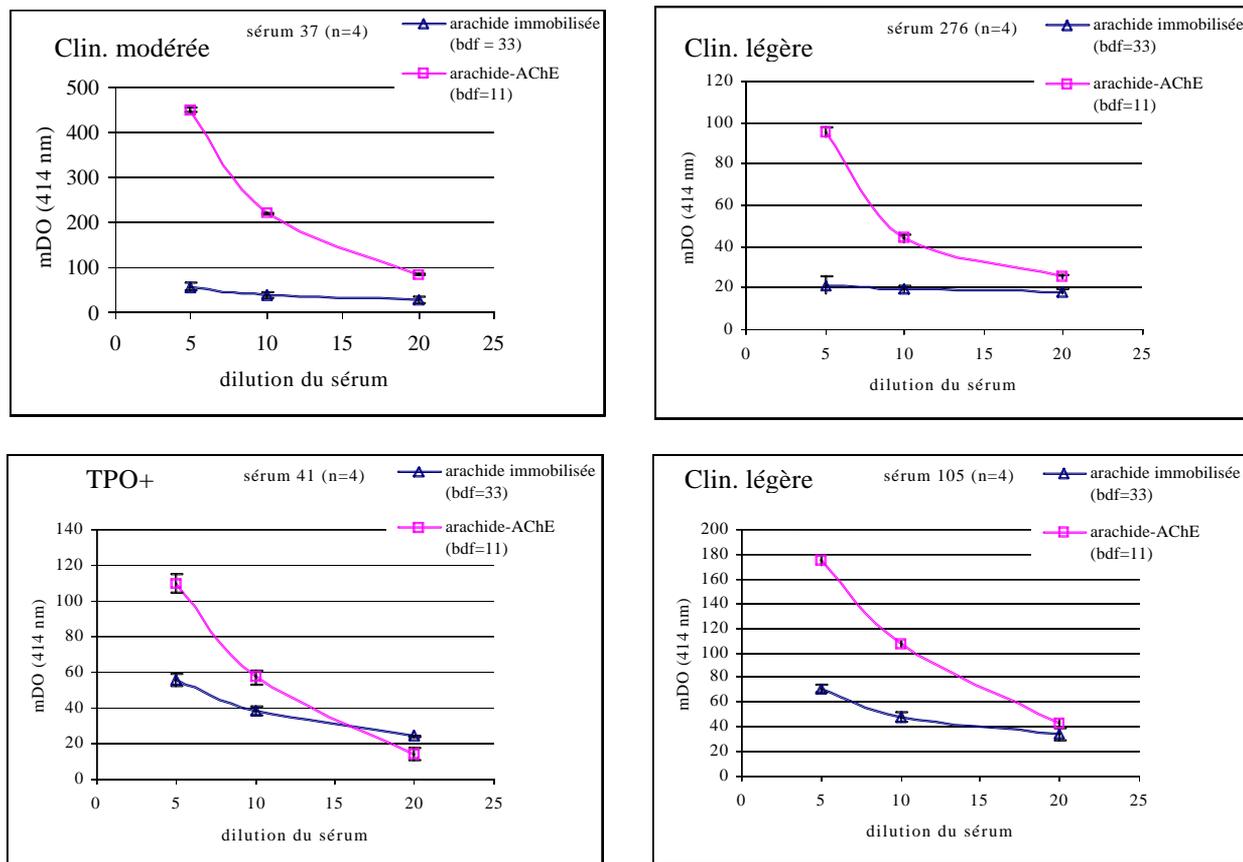


Figure 30 : courbes de dilution réalisées avec 4 sérums sur les deux formats de dosage : arachide brute immobilisée et arachide brute marquée à l'AChE. Chaque point a été réalisé quatre fois. Les écarts types ainsi obtenus pour chaque point sont représentés sur les courbes de dilution. Le signal non spécifique (bdf) est retranché pour chaque courbe de dilution.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu confirmer la bonne capacité de capture d'IgE spécifique par les anticorps monoclonaux anti-IgE pour ce format de dosage. Pour ce faire, nous avons choisi parmi notre sérothèque 10 sérums de patients présentant des rapports IgE spécifiques/IgE totales très variés. Ce rapport a été établi à partir des valeurs IgE spécifiques et IgE totales déterminées à l'aide du dosage par immobilisation des protéines. Pour ces 10 sérums, nous avons alors déterminé le signal correspondant à la réponse anti-arachide brute obtenu par capture des IgE (tableau 16).

Tableau 16 : étude de la capacité de capture d'IgE spécifique du format de dosage par capture des IgE en fonction du ratio IgE spécifique/IgE totales déterminés à l'aide du format de dosage par immobilisation de l'arachide brute.

N° sérum	IgE spécifique (UI.ml <sup>-1</sup> ) (arachide immobilisée)	IgE spécifique/ IgE totale (%)	Signal mDO (1/20) (capture des IgE)
42	809	46,52	3319
60	6,1	0,25	237
127	112	8,95	1331
186	111	6,06	1069
280	1,5	0,21	152
393	19	0,59	254
435	0,85	0,99	411
458	2	0,48	114
465	3,7	3,66	164
493	3	1,49	617

Malgré des rapports IgE spécifiques/IgE totales très faibles, de 0,21% à 46,52%, nous pouvons obtenir avec le dosage par capture des IgE des signaux significatifs et même forts. Pour le sérum 280 qui possède un faible taux d'IgE spécifique (1,5 UI.ml<sup>-1</sup>), un faible rapport IgE spécifiques/IgE totales (0,21%), nous obtenons un signal anti-arachide brute de 152 mDO lors de la capture des IgE. Le sérum 186 (111 UI.ml<sup>-1</sup>) qui possède un rapport IgE spécifique/IgE totale de 6,06% présente un signal anti-arachide brute de 1069 mDO par capture des IgE. Ces résultats montrent bien que la phase solide de ce format de dosage (LE27) possède une bonne capacité de capture des IgE et notamment des IgE spécifiques anti-arachide. Aussi, malgré le faible taux d'IgE spécifique anti-arachide, le système n'est pas limitant et peut détecter ces IgE « noyées » dans la fraction totale.

### ***b) Validation du format de dosage***

Compte tenu des résultats obtenus sur ces quelques sérums, nous avons décidé d'appliquer ce format de dosage à des sérums qui présentaient une réponse IgE spécifique très faible ou nulle lors de l'étude initiale employant l'arachide brute immobilisée, soit 62 sérums dont 51 présentaient une réponse nulle et 11 une réponse très faible. Les résultats du dosage de ces sérums par capture des IgE sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Etude de la réponse IgE spécifique anti-arachide brute de 62 sérums avec le dosage par capture des IgE de sérums présentant une réponse très faible ou nulle avec le dosage par immobilisation de l'arachide brute. TPO : test de provocation orale, TPL, test de provocation labial, pneumo : allergie respiratoire.

Immobilisation de l'arachide brute			
Réponse IgE très faible (n=11)		Réponse IgE nulle (n=51)	
Capture des IgE			
Réponse positive	Réponse négative	Réponse positive	Réponse négative
7	4	35	16
Dont 1 TPO +	Dont 2 TPO – et 2 pneumo négatif arachide	Dont 15 TPO + et 1 TPL +	Dont 9 TPO -, 1 TC +, 1 TC -, 1 pneumo, 1 TPO +12g, 1 allergie lait, 1 allergie blé et 1 clinique sévère

Parmi les 51 sérums présentant une réponse IgE anti-arachide nulle avec le premier format de dosage dont 15 provenaient de patients avec des TPO positifs, un signal positif a été détecté pour 35 sérums dans ce nouveau format de dosage. Les sérums ne présentant toujours pas de réponse positive, proviennent essentiellement de patients aux tests cliniques négatifs ou d'autres allergies alimentaires. De même, 4 sérums qui présentaient une faible réponse IgE avec le format classique mais des tests cliniques à l'arachide négatifs ne révèlent aucun signal avec le dosage par capture des IgE. Les résultats obtenus soulignent bien la meilleure sensibilité du dosage par capture des IgE. Ainsi, il permet de détecter un signal pour des sérums dont les tests cliniques (TPO, TPL) étaient positifs et d'obtenir une meilleure corrélation entre classe clinique positive et réponse IgE positive.

Pour approfondir la validation du dosage par capture des IgE, nous avons comparé des courbes d'inhibition réalisées sur les deux formats, en employant comme compétiteurs utilisés des extraits d'arachide brute. A partir de ces courbes, nous avons déterminé les valeurs des IC50, concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison des IgE à l'arachide brute immobilisée (format classique) ou à de l'arachide brute-AChE en solution libre (nouveau format). Cette expérience a été menée sur 40 sérums. Les valeurs d'IC50 obtenues pour chacun des formats ainsi que leurs ratios sont répertoriés dans le tableau 18 pour 8 sérums de notre population d'étude représentatifs des 4 classes cliniques. Ces 8 sérums sont également représentatifs de l'effet observé lors de la comparaison des deux formats de dosage pour les 40 sérums.

Tableau 18 : comparaison des valeurs des concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison (IC50) des IgE à l'arachide brute immobilisée (format classique) ou à l'arachide brute-AChE en solution (nouveau format).

clinique	sérum	IC 50 (ng/ml)		
		Arachide brute immobilisée (format classique)	Arachide brute-AChE (nouveau format)	Gain en sensibilité (nouveau par rapport à classique))
Légère	430	59,5	7,3	8,1
	457	18,0	6,3	2,9
Modérée	107	68,5	8,9	7,7
	186	24,7	17,7	1,4
Sévère	62	117,1	27,9	4,2
	110	72,6	11,7	6,2
nsp	190	32,2	17,7	1,8
	313	31,0	15,0	2,1

Pour tous les sérums, nous observons que les valeurs d'IC50 sont plus faibles avec le format de dosage par capture des IgE, ce qui traduit une meilleure sensibilité du dosage. Elles sont diminuées d'un facteur 1,4 à 8,1. Ainsi, pour la même concentration d'inhibiteur, le pourcentage de déplacement de la liaison IgE-Ara brute est plus important avec le dosage par capture des IgE.

### ***c) Application du dosage par capture des IgE à l'étude du profil de réponse IgE spécifique***

A la vue des résultats précédents, le dosage par capture des IgE présente une meilleure sensibilité que le format de dosage par capture des antigènes. Ce dosage par capture des IgE a donc été appliqué à l'étude de la réponse IgE vis-à-vis de notre répertoire des allergènes de l'arachide toujours afin de trouver une corrélation entre le profil de réponse IgE et la classe clinique. Le dosage est effectué à l'aide des 80 sérums en employant 5 allergènes marqués différents : Ara h 1, Ara h 2, polymère d'isoforme d'Ara h 3, isoforme d'Ara h 6, et arachide brute qui sert de référence pour la réponse IgE spécifique.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme pour les 80 sérums, allergène par allergène (figure 31). L'allergène appelé globuline 11S est un polymère de l'isoforme d'Ara h 3. Il s'agit du culot I ou entité 9 (page 70) qui présente plus de 50% de recouvrement de la protéine Ara h 3 de MM de 60 kDa.

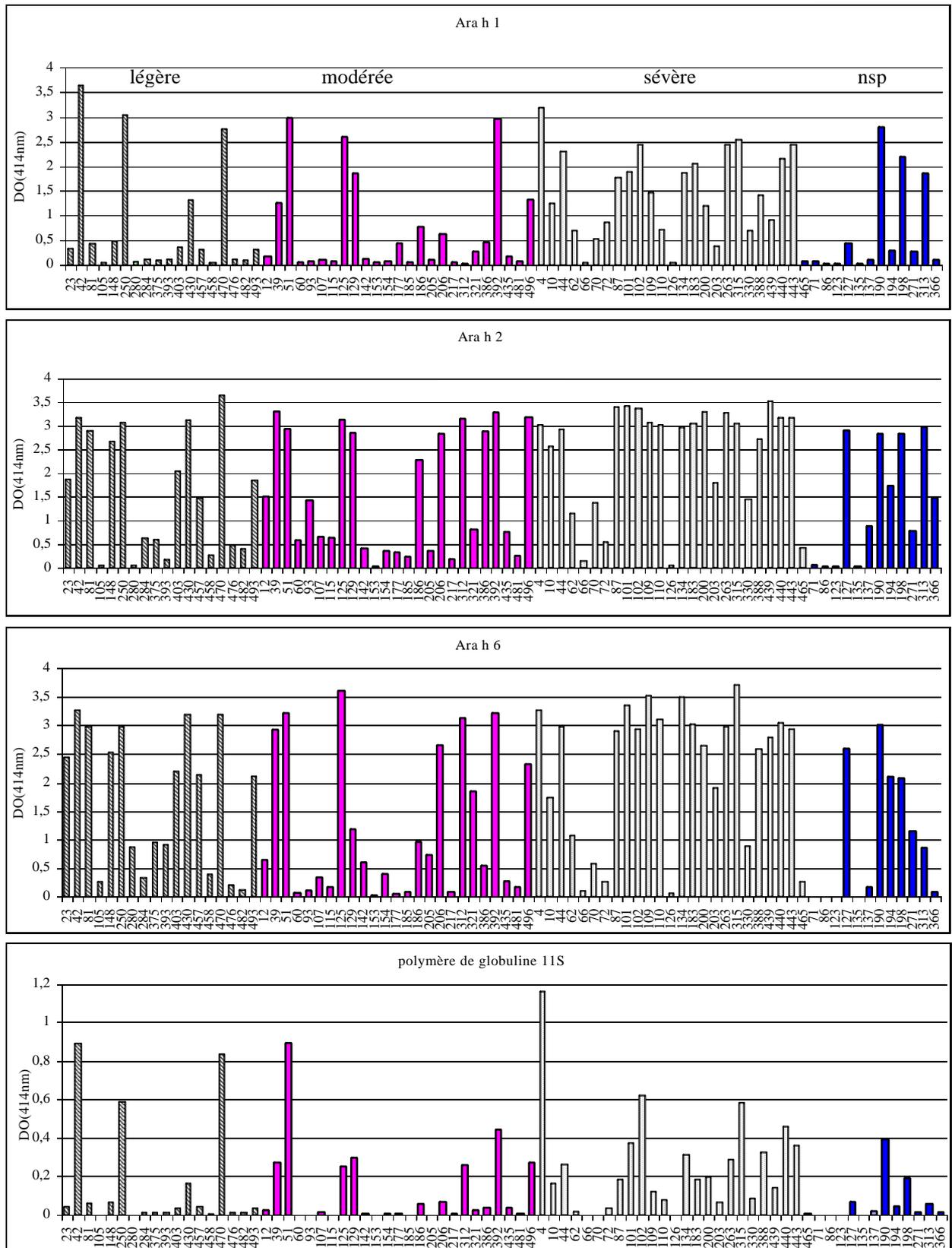


Figure 31 : réponse exprimée en unité d'absorbance (414 nm) des 80 sérums de clinique légère, modérée, sévère, nsp, avec les allergènes traceurs : Ara h 1- AChE, Ara h 2- AChE, Ara h 6- AChE, polymère globuline 11S- AChE.

Tout d'abord, il est important de noter que le profil de réponse IgE spécifique est similaire pour les différents allergènes (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6, fragments d'Ara h 3) sans distinction de classe clinique. Nous observons que l'intensité de la réponse IgE spécifique est plus importante pour les sérums de clinique « sévère » quelque soit l'allergène considéré comme nous avons pu déjà le constater avec le format classique de dosage des IgE spécifiques. De même, avec ce format de dosage par capture des IgE, nous ne détectons pas fondamentalement des réponses différentes de celles obtenues via le dosage classique par immobilisation de l'allergène. Par contre, ce dosage par capture des IgE permet d'obtenir un meilleur signal qui se traduit par une meilleure sensibilité de réponse. Ainsi, les sérums 148, 430, 457, 321, 388 et 194 qui fournissaient un signal très faible lors des tests IgE réalisés avec les différents allergènes (figure 28, page 94) présentent un signal plus important avec le format de dosage par capture des IgE contre les mêmes allergènes (figure 31, page 103).

Si nous analysons plus en détail les résultats obtenus, nous observons que la réponse IgE spécifique envers le fragment d'isoforme d'Ara h 3 (globuline 11S) est très faible quelque soit la classe clinique du sérum.

Pour les sérums de clinique « légère », « modérée » et « sévère », les albumines 2S, Ara h 2 et Ara h 6, présentent l'intensité et la fréquence de réponse les plus importantes. Les sérums de clinique « nsp » présentent une fréquence et une intensité de réponse assez marquées pour l'allergène Ara h 2.

Lors du dosage direct, l'intensité de la réponse IgE spécifique par classe clinique était assez similaire pour tous les allergènes Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 et polymère d'Ara h 3. Par contre, avec ce dosage par compétition avec capture des IgE, nous remarquons que le profil de réponse aux allergènes marqués à l'ACHé varie plus en fonction de la classe clinique. Cependant, toujours aucune corrélation entre la réponse aux allergènes marqués et la clinique ne peut être donnée.

Nous avons établi la corrélation de réponse entre le dosage classique (protéine immobilisé) et le nouveau dosage (capture des IgE) à l'aide du test de Spearman. Nous obtenons de bonnes corrélations avec l'arachide brute ( $r=0,946$ ) et avec les allergènes, Ara h 1 ( $r=0,896$ ), Ara h 2 ( $r=0,908$ ), Ara h 6 ( $r=0,893$ ) et les fragments de la globuline 11S ( $r=0,888$ ). Cette observation souligne encore que les résultats obtenus avec ce nouveau format de dosage ne sont guère différents de ceux obtenus avec le format classique, donc si la sensibilité est augmentée, la spécificité n'est pas modifiée. Pour le format de détection par capture des IgE, nous avons également pu déterminer une bonne corrélation (supérieure à 0,823) entre les réponses contre les différents allergènes-ACHé. Il apparaît certes que quelques sérums ne présentent pas les

mêmes tendances de réponse contre les différents allergènes mais la représentation graphique de ces corrélations (exemple de corrélation entre Ara h 2 et Ara h 6 en annexe II) souligne néanmoins un profil linéaire. Les albumines 2S, Ara h 2 et Ara h 6, présentent les signaux les plus forts mais également une corrélation de reconnaissance par les IgE spécifiques importante. Nous pouvons noter que certains sérums (81, 430, 39, 206 et 127) présentent une intensité de réponse anti-Ara h 2 et anti-Ara h 6 importante mais une faible intensité de réponse anti-Ara h 1 et anti-polymère de globuline 11S. Cette observation renforce l'idée d'un éventuel lien de réponse entre ces deux allergènes de la famille des albumines 2S.

#### **d) Conclusion**

Le format de dosage par capture des IgE permet d'obtenir une meilleure sensibilité de détection que le format de dosage classique par immobilisation des protéines, mais aucune corrélation du profil de réponse n'a pu être établie avec la classe clinique. Les sérums de clinique « sévère » présentent toujours une intensité de réponse plus importante et la part des albumines 2S dans l'immunoréactivité de l'arachide est à nouveau soulignée.

L'augmentation de la sensibilité a plusieurs explications. D'une part, en comparant les deux formats de dosage, nous mettons en opposition une liaison anticorps/allergène-AChE (dosage par capture des IgE) et une liaison anticorps/allergène immobilisé (dosage par immobilisation des protéines). Les modifications de conformation engendrées lors de l'immobilisation de l'allergène ne sont pas négligeables et beaucoup plus importantes que lors du marquage par l'acétylcholinestérase. Or, il est bien établi la part importante des épitopes conformationnels pour les allergènes alimentaires et notamment ceux de l'arachide. Nous avons ainsi obtenu une augmentation de la sensibilité du dosage par capture des IgE avec un traceur marqué non pas à la biotine mais à l'AChE et donc un procédé de révélation différent de celui décrit par Olivieri et al. (1993) et Plebani et al. (1986). A priori, le marquage à l'AChE ne modifie pas ou peu la reconnaissance de l'allergène par les IgE spécifiques.

D'autre part, les IgG peuvent interférer dans la liaison IgE-arachide brute immobilisée pour le format classique (Zeiss et al., 1981). Elles sont écartées dans le format par capture des IgE (Plebani et al., 1986). En effet, seules les IgE (totales et spécifiques) peuvent se lier à l'anticorps anti-IgE humaine (LE27) immobilisé sur le support. Les liaisons IgG spécifiques/allergènes sont donc évitées ce qui permet d'augmenter la sensibilité du dosage des IgE.

Lors des tests par compétition, nous avons obtenu un gain de sensibilité significatif et important avec le format par capture des IgE. Deux phénomènes permettent d'expliquer le gain de sensibilité lors de la compétition. Tout d'abord, la meilleure sensibilité du test direct obtenue permet d'utiliser une dilution plus importante du sérum ce qui est un avantage non négligeable. En effet, la règle générale dont dépend la sensibilité d'un dosage par compétition est que le dosage est d'autant plus sensible que l'anticorps et le traceur sont dilués ce qui favorise la compétition. De plus, comme nous l'avons expliqué précédemment, contrairement au système allergène immobilisé, les compétiteurs n'interagissent pas avec les liaisons IgG spécifiques.

#### **4. Tests in vivo : les tests cutanés**

L'allergénicité des grandes familles d'allergènes purifiés a été évaluée par des tests cutanés. Cette étude a été faite sur 15 patients allergiques à l'arachide. Il s'agit d'une étude clinique réalisée sous la responsabilité du Dr. E. Paty à l'Hôpital Necker dans le Service de Pédiatrie Allergologie Pneumologie du Pr. P. Scheinmann. Seulement 3 des 16 patients (numéros 4, 177 et 203) font partie de notre population de 80 patients. En effet, l'étude a été effectuée en fonction des malades suivis régulièrement et de la disponibilité de ceux-ci.

Les tests cutanés sont pratiqués avec un extrait d'arachide brute (grillée), et les allergènes purifiés à partir de cet extrait : Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 et le polymère de fragments d'isoforme d'Ara h 3 (entité 9). En parallèle, la réactivité IgE spécifique des patients contre ces mêmes préparations est évaluée au laboratoire par le format de dosage EAST par immobilisation des protéines et par capture des IgE. Tous les résultats sont présentés dans le tableau 19.

Une hétérogénéité est retrouvée dans la réponse IgE spécifique. Quatre sérums ont une réponse IgE négative à l'arachide brute immobilisée. Pour les autres cas, l'intensité de réponse IgE à l'arachide brute s'échelonne de 3 à plus de 800 UI.ml<sup>-1</sup>. Tous les patients ayant une réponse IgE anti-arachide brute présentent des IgE dirigées contre chacun des allergènes testés.

La réponse IgE analysée par la méthode de capture et révélation avec les allergènes-traceurs, présente des tendances plus divergentes et discriminantes. D'une part, 3 des 4 sérums qui ne présentaient pas de réponse IgE aux allergènes immobilisés sont, à l'aide de ce nouveau système, positifs contre au moins un des allergènes traceurs. D'autre part, les fréquences de

réponses IgE positives aux allergènes Ara h 2 et Ara h 6 couplés à l'ACHé sont plus fortes (>90%) que celles obtenues pour Ara h 1 ou la globuline 11S marqués (80%). L'analyse des tests cutanés confirme ces derniers tests. Ils montrent que tous les extraits testés sont plus ou moins capables de provoquer une réaction cutanée allergique. Ils permettent ainsi d'asseoir in vivo une réactivité allergénique proposée par les tests in vitro.

Il est intéressant de noter que le patient 620 a été incorporé dans l'étude du fait de sa seule positivité à l'issue d'un RAST contre l'arachide. Toutefois, ce patient n'a présenté, par la suite, aucun autre test in vitro comme in vivo positif et son état allergique reste à confirmer. Sur les 14 sérums conservés, les fréquences des tests cutanés positifs sont supérieures avec l'arachide brute, l'Ara h 2 et l'Ara h 6. Elles sont beaucoup plus faibles, 36% pour Ara h 1 et 57% pour le polymère de globuline 11S. Ainsi, le sérum 644 présente une réponse positive seulement pour Ara h 2 et Ara h 6. Le sérum 685, très faiblement positif avec les traceurs Ara h 2-ACHé et Ara h 6-ACHé et négatif avec les mêmes protéines immobilisées, présente des tests cutanés positifs pour ces deux mêmes allergènes.

Tableau 19 : dosage des IgE spécifiques (en UI.ml<sup>-1</sup>) et résultats des tests cutanés (diamètre de la papule en mm) pour une population de 16 patients. - : test cutané négatif ; + : test cutané. Glob11S : globuline 11S.

N°	IgE spécifique (UI.ml <sup>-1</sup> ) Format protéine immobilisée					IgE spécifique (mDO) Format Capture des IgE					Positivité test cutané				
	Ara brute	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 6	CulotI Glob11S	Ara brute	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 6	CulotI Glob11S	Ara brute	Ara h 1	Ara h 2	Ara h 6	CulotI Glob11S
572	59	49	35	51	35	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	229	144	120	119	147	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
588	831	544	440	398	511	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
177	0	0	0	0	0	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
609	279	214	182	194	159	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
611	0	0	0	0	0	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
618	482	269	206	159	256	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
620	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
203	3	3	3	2	1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
623	26	23	22	24	15	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
315	131	101	111	80	88	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
644	3	2	3	1	1	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
646	120	78	104	68	125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
655	60	43	31	50	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
685	0	0	0	0	0	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

### Conclusion

Hourihane et al. (1997b) ont utilisé le test cutané pour vérifier les cas d'allergies déclarés lors du questionnaire : 16 patients sur 111 présentaient un test négatif. Ils trouvent une corrélation entre le diamètre moyen de la papule et la sévérité des symptômes rapportés. Les résultats de Hill et al. (2001) présentent 270 tests positifs et montrent que des diamètres de papules supérieurs à 6 mm sont fortement prédictifs d'allergie et plus prédictifs que les mesures d'IgE. Plusieurs études dont celles de Clark et Ewan (2003) suggèrent que la prédiction de la sévérité de l'allergie à l'arachide est difficile à partir des résultats de tests cutanés. Quoiqu'il en soit, les patients avec des papules de diamètre supérieur à 8 mm et des dosages d'IgE spécifiques par la méthode CAP-FEIA (Pharmacia) supérieurs à 15 kU.l<sup>-1</sup> sont rarement tolérants lors de test de provocation orale.

Dans notre étude, lors des tests IgE, les allergènes Ara h 2 et Ara h 6 présentent des signaux de même intensité. Lors des tests cutanés, la même observation peut être avancée puisque 93% et 87% des sérums testés présentent une réactivité cutanée respectivement contre Ara h 2 et Ara h 6. Il faut donc souligner la concomitance d'allergénicité entre Ara h 2 et Ara h 6.

Ara h 1 représente une part importante de la réponse IgE spécifique anti-arachide brute lors des dosages des IgE spécifiques (tests in vitro). Par contre, lors des tests cutanés (tests in vivo), Ara h 1 n'est que faiblement reconnu autant en fréquence qu'en intensité. Il est possible que la structure de l'allergène soit responsable de cette discordance entre tests ELISA et tests cutanés. En effet, Ara h 1 est un allergène de masse moléculaire plus importante qu'Ara h 2 et Ara h 6, abondamment glycosylé (Burks et al., 1991). Malgré l'utilisation d'une aiguille pour faciliter le passage de la barrière cutanée, il est possible qu'Ara h 1 pénètre moins facilement ou soit moins facilement exposé au système immunitaire. Le même phénomène peut être évoqué pour expliquer la faible réactivité lors des tests cutanés du polymère de globuline 11S qui présente une masse moléculaire importante.

Avec les résultats cutanés, nous pouvons souligner que les allergènes de faible masse moléculaire, Ara h 2 et Ara h 6, présentent la réactivité IgE la plus prononcée. Ce phénomène pour Ara h 2 a également été observé par Koppelman et al. (2004). Les auteurs ont appuyé leur résultat avec des tests de libération d'histamine qui ont révélé le meilleur potentiel allergénique, notamment déclenchant, pour Ara h 2.

Même si la corrélation entre les tests cutanés et les dosages IgE spécifiques n'est pas parfaite, nous avons pu observer que si le dosage des IgE spécifiques est faible ou nul, il n'y a pas de réactivité cutanée.

## IV. Bilan

Dans cette première partie, nous avons donc purifié et caractérisé une partie du répertoire allergénique de l'arachide. La purification et l'identification des allergènes sont essentielles pour la compréhension de la réponse IgE spécifiques des patients allergiques à l'arachide. La connaissance des entités mises en cause dans l'allergénicité d'un aliment pourra conduire au développement de tests de diagnostic *in vitro* à la fois sensibles et spécifiques pour la discrimination des aliments ou protéines responsables de l'allergie.

Les résultats obtenus sont très prometteurs autant dans l'analyse nouvelle de l'immunoréactivité d'allergènes déjà décrits dans la littérature que dans la découverte de nouvelles structures d'allergènes. Les résultats présentés dans ce chapitre illustrent bien, s'il en était besoin, la complexité du problème de l'allergie à l'arachide. La multiplicité des allergènes, observée durant les différentes étapes de fractionnement ne représente qu'une partie du problème. En effet, l'implication de structures linéaires est évidente pour certaines protéines insensibles à la dénaturation et/ou renaturation tandis que l'existence de structures tridimensionnelles est démontrée par la discordance des résultats obtenus après de tels traitements pour d'autres entités. Il ne faut pas non plus occulter le potentiel de reconnaissance par les IgE de complexes macromoléculaires résultant de l'association de plusieurs protéines. L'intérêt de cette étude est donc d'aborder cette caractérisation par différentes techniques *in vivo* et *in vitro* susceptibles de fournir des résultats complémentaires et parfois discordants. De plus, l'emploi d'une sérothèque importante permet d'étudier la diversité des réponses immunologiques chez des sujets atopiques.

La fréquence de réponse dirigée contre les différents allergènes est importante et non spécifique d'une famille de protéines donnée ou d'une classe clinique de patients. Il a pu être remarqué que les albumines 2S présentaient la plus forte fréquence de reconnaissance. Les allergènes caractérisés de manière non exhaustive par ces travaux sont relativement nombreux et ne sont pas spécifiques d'un sérum donné. L'intensité de réponse IgE spécifique est plus importante pour les patients de classe clinique sévère. L'analyse de la réponse IgG ne permet pas de distinguer un profil spécifique d'une classe clinique particulière. Et, contrairement aux

IgE, les sérums de clinique sévère ne se distinguent pas par leur intensité de réponse des sérums des autres classes cliniques. Il semble donc que les IgE soient le seul marqueur fonctionnel de l'allergie alimentaire. Toutefois, un suivi longitudinal de sérums de patients allergiques à l'arachide pourrait apporter des informations sur l'évolution du taux d'IgG<sub>4</sub> en comparaison avec les taux d'IgE. Le développement d'un format de dosage « inversé » par capture des IgE nous a offert une augmentation de sensibilité et mime très bien les résultats de positivité/négativité obtenus lors des tests cutanés. L'utilisation de nos allergènes purifiés lors d'un test cutané a permis d'asseoir la réalité clinique de leur reconnaissance par les IgE.

Dans la partie suivante, nous allons nous attacher à l'étude particulière des épitopes de deux allergènes, ce qui permettrait de souligner certaines caractéristiques de ces allergènes et de proposer des explications quant à la complexité et l'hétérogénéité de la réponse IgE.

La première partie de ce mémoire a décrit notre démarche de purification des protéines de l'arachide et de caractérisation de leur potentiel allergénique. Les sérums de patients allergiques présentaient un phénomène généralisé de polysensibilisation et particulièrement, l'implication de trois grandes familles protéiques, les globulines 7S et 11S et les albumines 2S, dans la réponse IgE spécifiques. Toutefois, ces observations pourraient éventuellement découler de l'existence singulière de quelques épitopes majeurs, c'est-à-dire des régions d'une protéine préférentiellement reconnues par les IgE. La recherche d'épitopes des allergènes de l'arachide a fait l'objet de nombreuses études (Burks et *al.*, 1995a) (Burks et *al.*, 1997) (Stanley et *al.*, 1997) (Rabjohn et *al.*, 1999). Ainsi, les analyses effectuées ont conduit Beyer et *al.* (2003) à définir des épitopes « immunodominants » pas ou peu reconnus par des patients sensibilisés mais tolérants à l'arachide. Toutefois, de telles caractérisations ont été restreintes à l'étude de peptides synthétiques de 10 à 15 acides aminés.

## **A. ETUDE DES EPITOPES DE LA FAMILLE DES GLOBULINES 11S DE L'ARACHIDE : L'ALLERGENE ARA H 3**

### **I. la protéolyse naturelle des globulines 11S**

Les globulines 11S de l'arachide, qui représentent les protéines les plus abondantes de l'arachide, semblent subir un processus de protéolyse à l'intérieur de la graine avant de donner les formes matures. Ce processus est généralisable à toutes les globulines 11S qui sont clivées en polypeptides acides de 30 à 40 kDa et sous-unités basiques de 20 kDa caractéristiques de la protéine mature. Après un assemblage initial dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) comme trimère, la protéolyse déclenche l'assemblage subséquent en hexamères. Le site de clivage est conservé pour les globulines 11S parmi un large ensemble de plantes et comprend de manière caractéristique des asparagines et des glycines réparties dans une boucle mobile à la surface de la protéine (Adachi et *al.*, 2001). Le clivage est réalisé par une endopeptidase du côté carboxy-terminale des asparagines. Ce clivage constitue une condition absolue pour l'assemblage des hexamères (Jung et *al.*, 1998). Dans le cadre plus précis de l'arachide, Koppelman et *al.* (2003) ont décrit un site de clivage pour l'allergène Ara h 3 localisé entre les acides aminés N325 et G326. Les cystéines qui lient les deux sous-unités sont les cystéines en position 88 (sous-unité acide) et en position 332 (sous-unité basique) (Koppelman et *al.*, 2003). L'analyse de la séquence d'Ara h 3 a révélé

que le peptide amino-terminal de 14 kDa est assez long pour contenir la cystéine 88 et peut donc se lier de manière covalente à la sous-unité basique par un pont disulfure. Cependant, ces mêmes auteurs ont observé des structures hétéromultimériques contenant des fragments de 14 à 45 kDa. Ils ont ainsi suggéré qu'un processus protéolytique plus complexe non observé pour d'autres globulines 11S intervenait lors de la maturation de cette protéine. L'existence naturelle de fragments peptidiques chevauchants ou complémentaires constitue un outil indispensable pour la caractérisation des épitopes des globulines 11S. Par ailleurs, la multitude de fragments de globulines 11S présents dans la graine nous permettra également d'observer les modifications de la réponse IgE en fonction du degré de protéolyse, parfois prononcée. Ces deux objectifs nous ont ainsi conduits à dissocier les polymères de globulines 11S et à isoler et purifier leurs différents constituants.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Sérothèque**

Pour des raisons de disponibilité des sérums, une sélection a été effectuée sur la base de notre population composée à l'origine de 80 prélèvements. Les 40 sérums choisis sont issus également de patients présentant des symptomatologies « légères » (n=9), « modérés » (n=13), « sévères » (n=13) ou « non clairement définis (nsp) » (5).

### **2. Purification et caractérisation des fragments de globulines 11S**

Les démarches effectuées pour purifier les différents fragments de globulines 11S ont fait essentiellement appel aux techniques décrites dans la partie matériel et méthodes du chapitre 1 (pages 48 à 49), à savoir les chromatographies d'échange d'ion et en phase inverse, les électrophorèses SDS PAGE et bidimensionnelle et la spectrométrie de masse.

Par contre, le fractionnement préalable des polymères a été effectué par chromatographie d'échange d'anion en conditions réductrices. Les modifications suivantes ont été apportées aux conditions décrites page 49. Avant séparation chromatographique, les échantillons sont préalablement dénaturés en présence de  $\beta$ -mercaptoethanol (1%, v/v). La colonne est

équilibrée en tampon Tris 40 mM pH 7,4 contenant 4M d'urée et 2 mM de DTT et l'élution est réalisée par un gradient d'une solution de NaCl à 1 M.

Un second système chromatographique a été également utilisé, faisant appel à la capacité de certains agents dénaturants à dissocier les polymères de l'arachide nommée originellement arachine (Tombs et Lowe, 1967). Il a ainsi été réalisé une chromatographie sur colonne échangeuse de cation (source 30) en présence d'urée 6 M, d'acide formique 150 mM et de sulfite de sodium 100 mM. L'élution est réalisée selon un débit de 4 ml.min<sup>-1</sup> par un gradient linéaire d'une solution de NaCl à 1 M.

### **3. Etude de l'immunoréactivité des globulines 11S**

L'étude de l'immunoréactivité est réalisée à l'aide du test immuno-enzymatique direct par immobilisation des protéines, décrit dans le premier chapitre (pages 78 à 82).

### III. Résultats et discussion

#### 1. Purification et caractérisation des fragments de globulines 11S

Les deux différents systèmes chromatographiques en échange d'ion ont certes permis de dissocier les polymères mais n'ont pas séparé efficacement les différentes sous-unités. La purification des entités isolées a été finalisée par chromatographie en phase inverse. A la suite des premières analyses électrophorétique et chromatographique, seules les fractions les plus résolues et représentatives de chaque sous-unité ont été conservées pour les études d'immunoréactivité. De plus, deux précédents fragments de globulines 11S isolés à l'origine dans le surnageant 40% sont intervenus dans ce travail. Le profil électrophorétique de l'ensemble des fractions sélectionnées est représenté en figure 32.

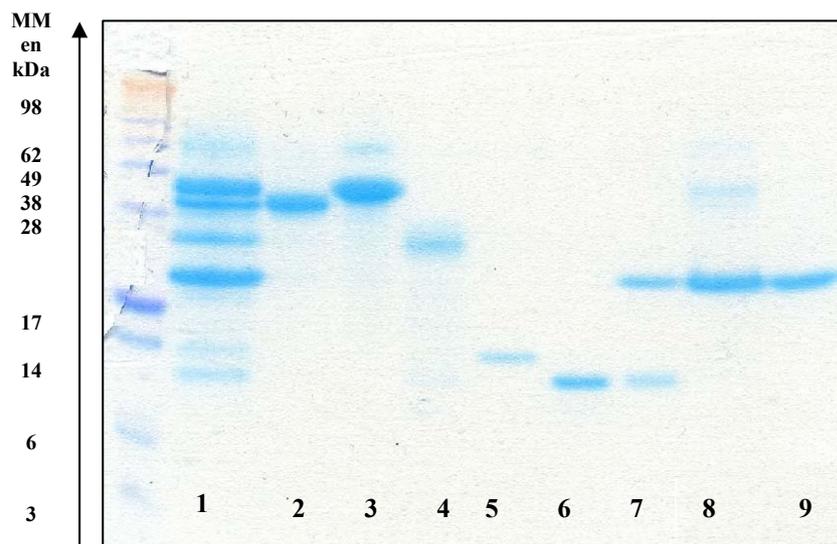


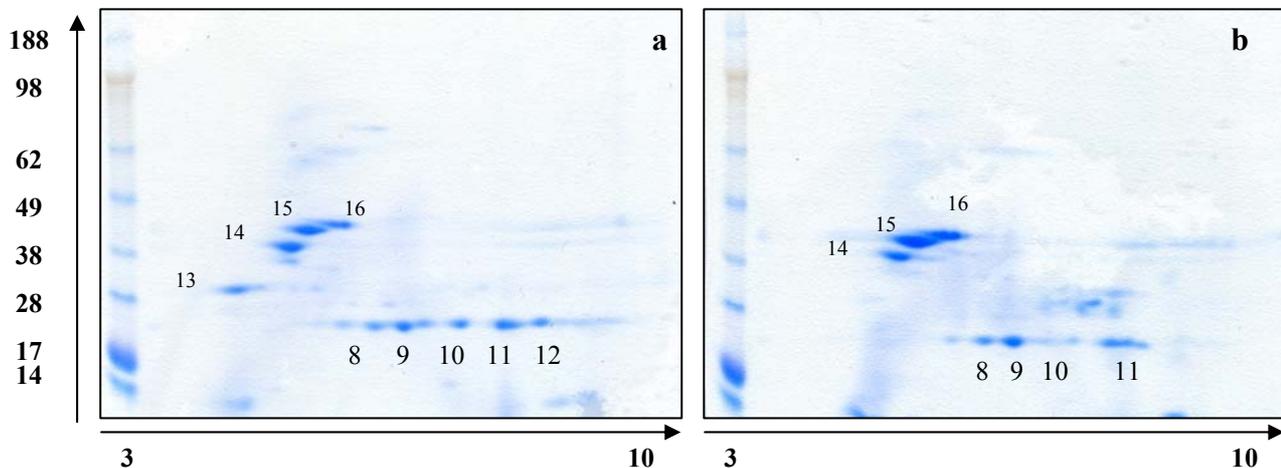
Figure 32 : profil électrophorétique en conditions dénaturantes et réductrices des globulines 11S sur colonne phase inverse, sauf pour l'entité I qui correspond à une fraction de chromatographie d'échange d'ion.

Les profils électrophorétiques des fragments isolés correspondent aux différentes bandes qui constituent l'échantillon de départ représenté dans le puits 1. Nous retrouvons ainsi les bandes majoritaires autour de 30 kDa (puits 2 et 3) et proche de 20 kDa (puits 4, 7, 8 et 9). Des bandes moins intenses observées dans le puits 1 et de masse moléculaire inférieure à 20 kDa sont obtenues dans les puits 5 et 6. Les images de chaque fraction isolée démontrent la présence unique ou du moins majoritaire d'une bande protéique. Par contre, la fraction du

puits 7 se caractérise par deux bandes distinctes. Ces entités, isolées lors du premier chapitre, représentent deux fragments de 15 kDa et 25 kDa associées par un pont disulfure (tableau 12 page 70).

Ces observations établies sur la seule séparation par la masse moléculaire sont confirmées lors de l'électrophorèse bidimensionnelle, technique plus résolutive puisqu'elle permet la séparation suivant deux critères, le point d'isoélectrofocalisation et la masse moléculaire.

Deux électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisées avec le polymère de glycine de départ (figure 33a) et à partir des différentes fractions de globulines 11S purifiées (figure 33b). La numérotation des spots correspond à la numérotation portée sur l'électrophorèse bidimensionnelle de l'extrait brut d'arachide grillée (figure 13, page 56).



**Figure 33 : électrophorèses bidimensionnelles réalisées à partir des différentes fractions de globulines 11S purifiées. (a) polymère de fragments de globulines 11S. (b). entités 2 à 9 : mélange de plusieurs fragments de globulines 11S purifiés**

Les profils électrophorétiques observés dans le polymère de départ (figures 32 et 33a) sont pratiquement reproduits dans les images obtenues après mélange d'une quantité équivalente des différentes entités isolées et sélectionnées (figures 32 et 33b). Seule l'entité 13, la plus acide, présente dans le polymère (figure 33a) n'est retrouvée dans aucune des fractions isolées (figure 33b).

Les différents spots 14 à 16 de masse moléculaire inférieure à 30 kDa et présentent un pHi acide et les spots 8 à 12 de masse moléculaire inférieure à 20 kDa et possédant un pHi basique obtenus dans le polymère sont conservés dans le mélange de fractions.

La caractérisation des différents fragments sélectionnés a été complétée par spectrométrie de masse associée à des techniques de protéomique. Les caractéristiques des fragments sont détaillées dans le tableau 20.

**Tableau 20 : caractéristiques des fragments de globulines 11S isolés : masses moléculaires obtenues par spectrométrie de masse MALDI TOF, recouvrement de l'allergène après hydrolyse trypsique des fragments et identifications des peptides tryptiques.**

N° puits (figure 1)	Origine	Masse moléculaire en kDa	Recouvrement de l'isoallergène d'Ara h 3
1	Culot 40%	Plusieurs entités	Polymères de fragments localisés entre les positions 25 et 511
2	Culot 40%	35	46-368
3	Culot 40%	38	26-311
4	Culot 40%	25	27-216
5	Surn 40% pool XIV	11,9	110-207
6	Culot 40%	12,5	27-122
7	Surn 40% pool V	15 + 25 = 40	25-120 + 369-511
8	Culot 40%	20,5	364-526
9	Culot 40%	20,5	287-434

Les résultats électrophorétiques et de spectrométrie de masse sont concordants.

L'analyse protéomique effectuée sur les entités confortent ou même précisent les identifications menées lors du premier chapitre. L'ensemble des fragments isolés recouvre pratiquement l'intégralité de la séquence d'une globuline 11S répertoriée comme Gly1, exception faite du peptide signal. Le positionnement des séquences a été effectué à partir de la séquence de Gly1 (AAG01363/gi9864777) répertoriée qui prend en compte le peptide signal regroupant la région 1-21.

La majorité des peptides recouvrent deux tiers de la séquence partie amino-terminale de la globuline 11S. Trois peptides se situent sur la partie amino-terminale de la globuline 11S et ont une extrémité carboxy-terminale progressivement tronquée : f(27-311), f(27-216) et f(27-122). Un des fragments, f(364-526), concerne la partie carboxy-terminale de la molécule. Un fragment de séquence proche est retrouvée dans une fraction, associée avec l'extrémité amino-terminale f(25-120). L'analyse protéomique permet de définir une séquence recouverte par les peptides mais ne délimite pas exactement les extrémités amino- et carboxy-terminales. La prise en compte de la masse moléculaire de chaque sous-unité isolée ne permet pas non plus d'obtenir la délimitation exacte du fait de l'existence probable de modifications post-traductionnelles notamment des glycosylations. Le séquençage en cours devrait permettre de définir l'extrémité amino-terminale.

### *Conclusion*

Les premières études portant sur l'allergène Ara h 3 ont décrit l'existence d'un fragment de 14 kDa (Eigenmann et *al.*, 1996) issue d'une protéine de 60 kDa. Koppelman et *al.* (2003) ont décrit l'association d'une sous-unité acide (1-325 équivalent sur la figure 7 du chapitre 1 à 22-353) et une sous-unité basique (326-525 équivalent à 354-540), liées par un pont disulfure entre la cystéine 88 (position 109 en figure 7) et la cystéine 332 (position 360). En fait, le polymère de globuline 11S présente des associations plus complexes avec une hétérogénéité de fragments. Nous retrouvons différents fragments appartenant à la sous-unité acide : 26-311, 27-122, 27-216 et 110-207, suggérant la possibilité de plusieurs clivages (Koppelman et *al.*, 2003). Pour le fragment 287-434, le clivage entre les deux sous-unités n'a pas eu lieu, ce qui indique un processing incomplet de la protéine, phénomène observé par Koppelman et *al.* (2003). Nous avons également isolé deux fragments, 25-120 et 369-511, reliés par un pont disulfure. Koppelman et *al.* (2003) ont isolé un fragment de 14 kDa, assez long pour contenir la cystéine 88 (109) et pouvant ainsi être lié à un fragment basique d'Ara h 3. Les mêmes auteurs ont observé des peptides de 16 kDa et 28 kDa dont les processus d'hydrolyse sont plus difficile à interpréter. Un alignement approximatif les positionne entre les résidus 217 à 325 (soit 13 kDa) et les résidus 311 à 510 (soit 23 kDa), suggérant pour ce dernier un processus d'hydrolyse incomplet d'Ara h 3.

Nous avons donc isolé des fragments d'hydrolyse amino-terminaux (26-311, 27-122, 27-216, 110-207) n'ayant pas conservé de liaison avec des fragments de la partie basique, un fragment pour lequel le processus de protéolyse de la protéine n'est pas complet et deux fragments, un acide (25-120) et un basique (369-511) toujours liés par le pont disulfure. Les fragments isolés soulignent la complexité des processus de protéolyse et d'association observés pour les globulines 11S de l'arachide. Dans la mesure où la dissociation en sous-unité n'entraîne pas la perte de la reconnaissance par les IgE, la multiplicité des fragments devient un avantage pour la détermination des épitopes.

De plus, cette hydrolyse naturelle laisse envisager que l'immunoréactivité de la protéine est essentiellement associée à des séquences linéaires.

## **2. Immunoréactivité des fragments de globulines 11S**

L'immunoréactivité des différents fragments de l'isoallergène d'Ara h 3 purifiés a été analysée par un test ELISA direct à l'aide des 40 sérums sélectionnés.

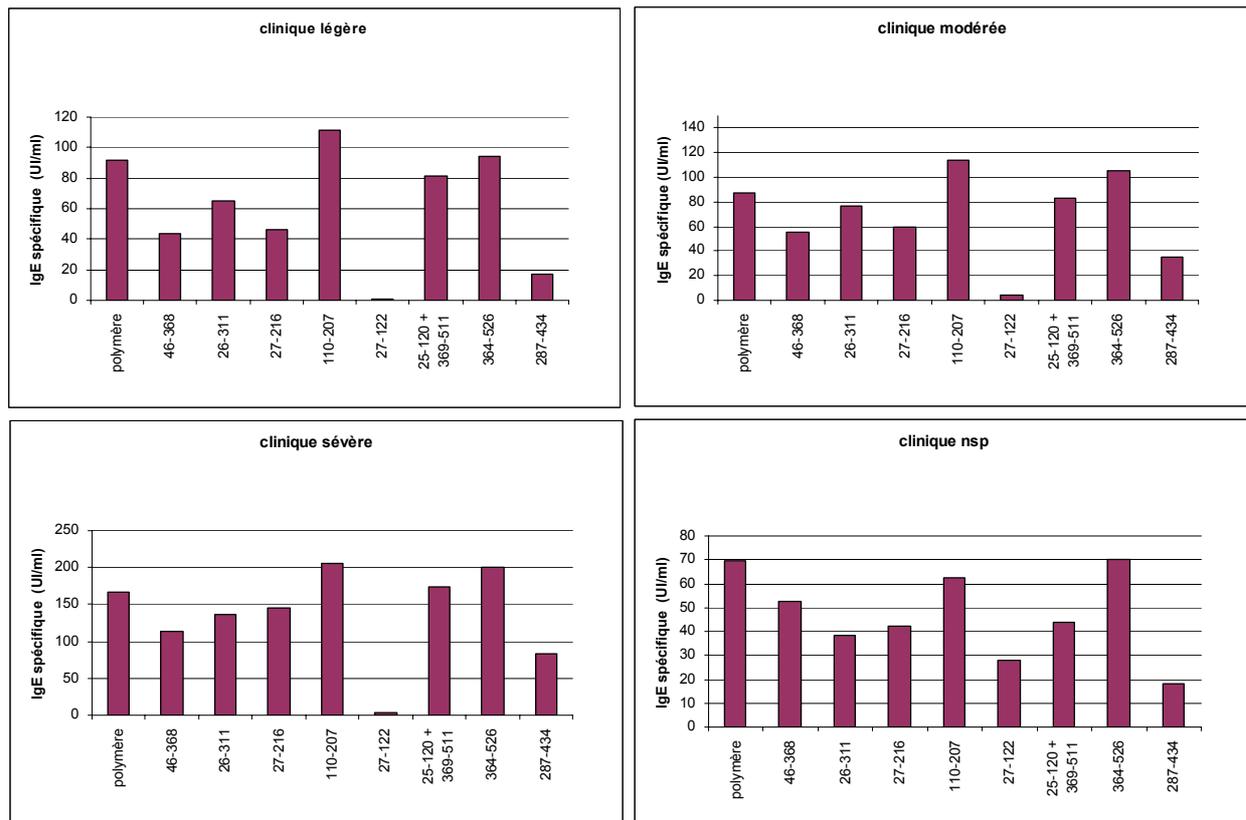
Les fréquences de réponse IgE spécifiques ont été calculées et exprimées en pourcentage pour chaque classe clinique (tableau 21).

**Tableau 21 : fréquence de reconnaissance, exprimée en %, des différents fragments de globuline 11S par les IgE de sérums des patients allergiques pour chaque classe clinique.**

clinique	Polymères de globulines 11S	46-368	26-311	27-216	110-207	27-122	25-120+ 369-511	364-526	287-434
légère	78	44	67	56	89	11	56	67	22
modérée	69	46	69	54	77	8	62	62	46
sévère	92	85	92	85	92	31	85	92	77
nsp	80	60	80	60	80	20	80	80	40
toutes	80	60	78	65	85	18	70	75	50

Les fragments les plus immunoréactifs en terme de fréquence de réponse présentent des valeurs supérieures à 80%. De plus, la majorité des fragments testés, notamment ceux comprenant des régions complémentaires de la globuline 11S, est reconnue par les IgE. La partie basique 364-526 ainsi que la région complémentaire 46-368 peuvent engendrer une réponse IgE spécifique. Seule la région 27-122, petit fragment amino-terminal, entraîne des fréquences de reconnaissance inférieures à 50% pour toutes les classes cliniques. Les fréquences de reconnaissance de chaque fragment sont relativement conservées d'une classe clinique à une autre. Cependant, nous pouvons observer que, quelque soit le fragment testé, la fréquence de reconnaissance la plus forte est obtenue avec la classe clinique « sévère ».

Les résultats sont accentués avec la quantification de la réponse IgE spécifique, dont les valeurs moyennes obtenues pour chaque classe clinique sont représentées sur la figure 34.



**Figure 34 :** représentation pour chaque classe clinique de la réponse IgE spécifique moyenne contre les différents fragments de globulines 11S purifiés et représentatifs de l'isoallergène d'Ara h 3. Les fragments sont nommés par leur position sur la séquence de la protéine (AAG01363).

Le profil de réponse IgE spécifique, exprimée en terme de moyenne, pour les différents fragments est similaire entre les différentes classes cliniques. Seul le fragment 27-122 est mieux reconnu par les sérums de la clinique « nsp » du fait de la réponse élevée observée pour deux sérums. Cette classe clinique regroupe des sérums de patients de symptomatologies très hétérogènes, pas uniquement reliées à l'arachide. Certains de ces patients peuvent être diagnostiqués par la suite comme des patients de clinique sévère.

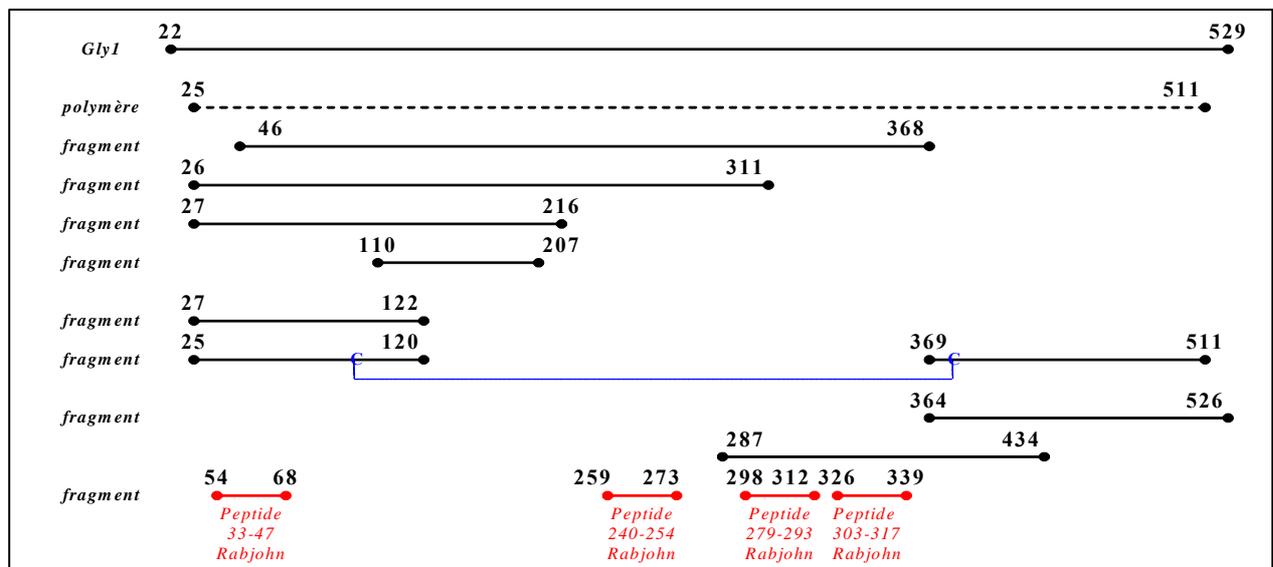
Les fragments 27-216 et 26-311 présentent une intensité de réponse IgE spécifique assez importante pour les différentes classes cliniques alors que, le fragment 27-122, recouvrant les 100 premiers résidus des peptides précédents, n'est que très peu reconnu par les IgE spécifiques (figure 34). Parallèlement, les intensités de réponse du fragment 110-207 sont les plus fortes et équivalentes au polymère d'origine. L'extrémité carboxy-terminale f(364-526) présente elle aussi des réponses IgE très fortes et proches des valeurs obtenues avec le fragment f(110-207). Le fragment f(369-511), de séquence proche, associée à l'extrémité amino-terminale f(25-210), engendre également une réponse IgE importante. Enfin, le fragment central f(287-434) est faiblement reconnue par les IgE.

Ainsi, les intensités de réponse les plus fortes sont observées pour les fragments 364-526, 25-120+369-511 et 110-207.

### Conclusion

Gly 1, une isoforme d'Ara h 3, uniquement décrite comme une protéine de la famille des globulines 11S de l'arachide, est reconnue par les IgE de patients allergiques à l'arachide en accord avec les travaux récemment publiés par Boldt et al. (2005).

Les IgE de patients allergiques à l'arachide reconnaissent des régions multiples et différentes de la globuline 11S que nous avons purifiée. Tous ces fragments ainsi que les peptides décrits par Rabjohn et al. (1998) sont positionnés par rapport à la séquence de Gly1 sur la figure 35.



**Figure 35 : alignement des fragments de Gly1 purifiés par rapport à la protéine non maturée. Les peptides synthétisés par Rabjohn et al. (1998) sont représentés en rouge et positionnés par rapport à la séquence de Gly1 (gi9864777). Le pont disulfure reliant les deux fragments 25-120 et 369-511 est représenté en bleu.**

Seule la partie amino-terminale 27-122 semble dépourvue d'épitope majeur. La sous-unité acide f(1-325) décrite par Koppelman et al. (2003) apparaît fortement reconnue par les IgE. La perte de ses extrémités amino- et carboxy-terminales n'engendre pas de diminution significative de l'immunoréactivité, la majorité des épitopes étant associée à la partie f(110-207).

Cependant, contrairement aux observations de Rabjohn et al. (1999) décrivant 4 épitopes de 10 à 15 acides aminés répartis tout le long de la sous-unité acide (33-47, 240-254, 279-293 et

303-317), la partie acide ne porte pas l'ensemble des épitopes. En effet, conformément à Koppelman et *al.* (2003), la partie basique peut également lier les IgE. Leurs fréquences de réponses positives ainsi que leurs fortes intensités de réponse IgE soulignent même l'existence d'épitopes « majeurs » au sein de cette structure, en particulier sur la partie carboxy-terminale f(364-526) qui, libre ou associée avec le fragment f(25-120), est fortement reconnue par les IgE. La perte de l'extrémité carboxy-terminale observée avec le fragment f(287-434) entraîne une forte diminution de l'immunoréactivité, restreignant la majeure partie de la reconnaissance dans la séquence 435-525 de la globuline 11S.

Nous ne retrouvons pas l'épitope immunodominant 279-293 décrit par Rabjohn et *al.* (1999) pour Ara h 3. En effet, le fragment susceptible de contenir cet épitope, f(287-434), est peu reconnu par les IgE de notre population de sérum. De plus, le fragment de la sous-unité acide f(26-311) également susceptible de contenir cet épitope présente peu de diminution de son immunoréactivité lorsqu'il est privé de cette région, notamment pour le fragment f(27-216). Outre la différence de population étudiée, la différence de méthodologie utilisée pour déterminer les épitopes peut expliquer la divergence de nos travaux avec les résultats de Rabjohn et *al.* (1999) puisque nous employons de plus gros fragments « naturels » au lieu de petits peptides synthétiques et que nos mesures sont effectuées par ELISA et non immunempreintes.

## IV. Conclusion

La mise au point de conditions particulières de procédés de purification, notamment des chromatographies d'échange d'anion en conditions réductrices ou d'échange de cation, a permis d'isoler les fragments d'hydrolyse des globulines 11S. Les entités ainsi obtenus sont constituées de différentes régions des sous-unités acide et basique décrite par Rabjohn et *al.* (1999) et Koppelman et *al.* (2003) ce qui suggère la présence de plusieurs sites de clivage par des endoprotéases naturelles (Koppelman et *al.*, 2003). Nous avons également isolé un fragment comportant une partie au moins des deux sous-unités n'a pas eu lieu, soulignant ainsi un processus incomplet d'hydrolyse également observé par Koppelman et *al.* (2003).

L'étude de ces fragments d'hydrolyse souligne que l'immunoréactivité des globulines 11S ne repose pas que sur un seul épitope. En s'intéressant à des fragments naturels, nous avons pu cerner deux régions particulièrement immunoréactives, l'extrémité carboxy-terminale et une région de la sous-unité acide et plus centrale (110-207). En dépit de processus de dégradation

naturelle, l'immunoréactivité des globulines 11S est significative. Cette multitude d'épitopes, petits fragments d'hydrolyse et fortement reconnus par les IgE, sont susceptibles d'être présentés au système immunitaire au niveau du tractus gastro-intestinal, une des voies possibles de sensibilisation.

## **B. ETUDE DES EPITOPES DE LA FAMILLE DES ALBUMINES 2S DE L'ARACHIDE**

### **I. Introduction**

L'immunoréactivité des globulines 11S de l'arachide repose sur plusieurs épitope répartis sur les sous-unités composant ces protéines et fortement reconnus par les IgE. Les albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6) présentent une allergénicité majeure (réponse IgE spécifique importante et forte réactivité lors des tests cutanés) et sont constituées aussi d'une multitude de protéines et d'isoformes. L'existence de structures communes à ces protéines (Kleber-Janke et *al.*, 1999) pourrait permettre de caractériser un épitope commun, voire majeur et pourrait permettre ainsi de montrer l'implication des réactions croisées, notamment entre Ara h 2 et Ara h 6, dans une part importante de l'allergénicité des albumines 2S. Par ailleurs, les études précédentes ont montré que malgré une dégradation naturelle importante, les globulines 11S conservaient un potentiel allergénique. Il nous est paru intéressant d'effectuer des analyses semblables avec les albumines 2S de l'arachide dont l'une des caractéristiques structurales est un agencement conservé de 8 cystéines (-C-C-CC-CXC-C-C-) conduisant à l'existence de 4 ponts disulfures.

L'identification d'épitopes communs ou propres à chaque albumine 2S ainsi que la nature conformationnelle éventuelle ont été étudiées par trois voies complémentaires. La première profite de la multiplicité des isoformes pour analyser l'implication de séquences surnuméraires dans l'immunoréactivité d'Ara h 2. La seconde repose sur la modification structurale par réduction des ponts disulfures et l'analyse de la réponse IgE spécifique résultante. La dernière étude fait appel à une dégradation enzymatique non naturelle (trypsinolyse) permettant d'évaluer la réponse IgE aux peptides tryptiques d'Ara h 2.

## 1. Réduction et carboxyméthylation des albumines 2S

Les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, sous forme lyophilisée, sont réduits dans un tampon Tris 100 mM pH 8,0 contenant 400 mM d'urée 400 mM, 20 mM de DTT, (ratio 10/1, p/v) pendant 2 h à 56°C. Les groupements sulfydryls sont ensuite bloqués par réaction avec une solution d'iodoacétamide à 200 mM final pendant 4 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les différents échantillons sont dialysés contre du tampon phosphate 50 mM pH 7,4 pendant 24 h avec 3 changements de bain et conservés à -20°C pour les analyses ultérieures.

## 2. Hydrolyse enzymatique par la trypsine

### *a) Tampons*

La trypsine, lyophilisée (20 µg), est reprise dans une solution HCl (200 µl) à 1 mM à un rapport 1/10 (p/v).

Vingt milligrammes de protéine à digérer, sous forme lyophilisée, est reprise dans 5 ml de tampon Tris HCl 25 mM pH 8,5.

### *b) Digestion*

La digestion est menée par la trypsine (V5111, Promega) à un ratio 1/400 à 37°C. Vingt milligrammes d'Ara h 2 sont mis à digérer. Des études préliminaires menées sur la cinétique de digestion d'Ara h 2 par la pepsine ont montré des profils d'hydrolyse différents à 1h et 4h de digestion. Ainsi, nous réalisons une cinétique de digestion avec 3 points de prélèvement : le temps zéro (t0), une heure (t1) et 4 heures (t2) de digestion. Pour chaque temps, il sera prélevé le volume contenant 2 mg d'équivalent protéique (t0), 5 mg d'équivalent protéique (t1) et 13 mg d'équivalent protéique (t2). Après chaque prélèvement, la réaction enzymatique est arrêtée par acidification en ajoutant une solution de TFA 0,1% volume à volume. L'addition de TFA répond aux conditions initiales de chromatographique en phase inverse. Les solutions sont conservées à -20°C si l'analyse de la digestion n'est pas immédiate.

### ***c) Suivi chromatographique de la digestion enzymatique et purification des hydrolysats***

Le processus de digestion enzymatique est suivi par analyse chromatographique en phase inverse sur une colonne semi-préparative de type C4 (25 x 10 mm, vydac, Interchim). La colonne est équilibrée en solution eau/TFA 0,1% et l'élution est menée par un gradient linéaire d'acétonitrile contenant 0,04% de TFA de 0 à 50% en 10 volumes de colonne et de 50 à 60% en 1 CV.

La purification des peptides isolés est finalisée à l'aide d'un second système chromatographique en phase inverse qui fait appel à une phase greffée mixte de type C2/C18 ( $\mu$ RPC C2/C18, Pharmacia) et à des conditions d'élution différentes de celles du premier système. La colonne est équilibrée en tampon acétate d'ammonium 25 mM pH 6,74 et l'élution est réalisée par un gradient linéaire de 10 à 60% de tampon acétate d'ammonium 25 mM pH 6,74 contenant 60% d'acétonitrile en 15,6 volumes de colonne.

Après chaque étape chromatographique, les fractions sont caractérisées par spectrométrie de masse MALDI TOF et par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide selon des conditions adaptées à la résolution de peptides.

## **3. Electrophorèses en conditions dénaturantes**

Les électrophorèses sont effectuées avec le système vertical Novex<sup>®</sup> (Invitrogen) en conditions dénaturantes mais non réductrices. Des gels tricine de 12% (Invitrogen) sont adaptés à la séparation des peptides de faible masse moléculaire. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 85°C pendant deux minutes avec un tampon d'échantillon concentré deux fois (2X) (sample Novex buffer, Invitrogen).

Les marqueurs de taille utilisés couvrent une gamme de masse moléculaire de 3 kDa à 188 kDa (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). Les échantillons sont déposés à raison de 2  $\mu$ g par puits. La migration est réalisée pendant 90 minutes à 125 V constant. Le gel est ensuite révélé au moyen d'une solution commerciale, le SimplyBlue<sup>™</sup> SafeStain (Invitrogen) de type Bleu de Coomassie. Après 1h d'agitation à température ambiante, les gels sont ensuite lavés par trois bains successifs d'eau milliQ de 15 minutes et séchés à 60°C pendant 1 h.

#### **4. Spectrométrie de masse**

La méthode d'analyse de la masse moléculaire des hydrolysats est la spectrométrie de masse MALDI TOF déjà décrite dans le matériel et méthodes du premier chapitre de ce manuscrit (pages 52 à 53).

#### **5. Etude de l'immunoréactivité des hydrolysats**

L'immunoréactivité des hydrolysats est étudié à l'aide des tests de type ELISA direct et par compétition avec capture des IgE comme cela a été décrit dans le matériel et méthodes du premier chapitre de ce manuscrit (pages 78 à 85).

## **II. Résultats et discussion**

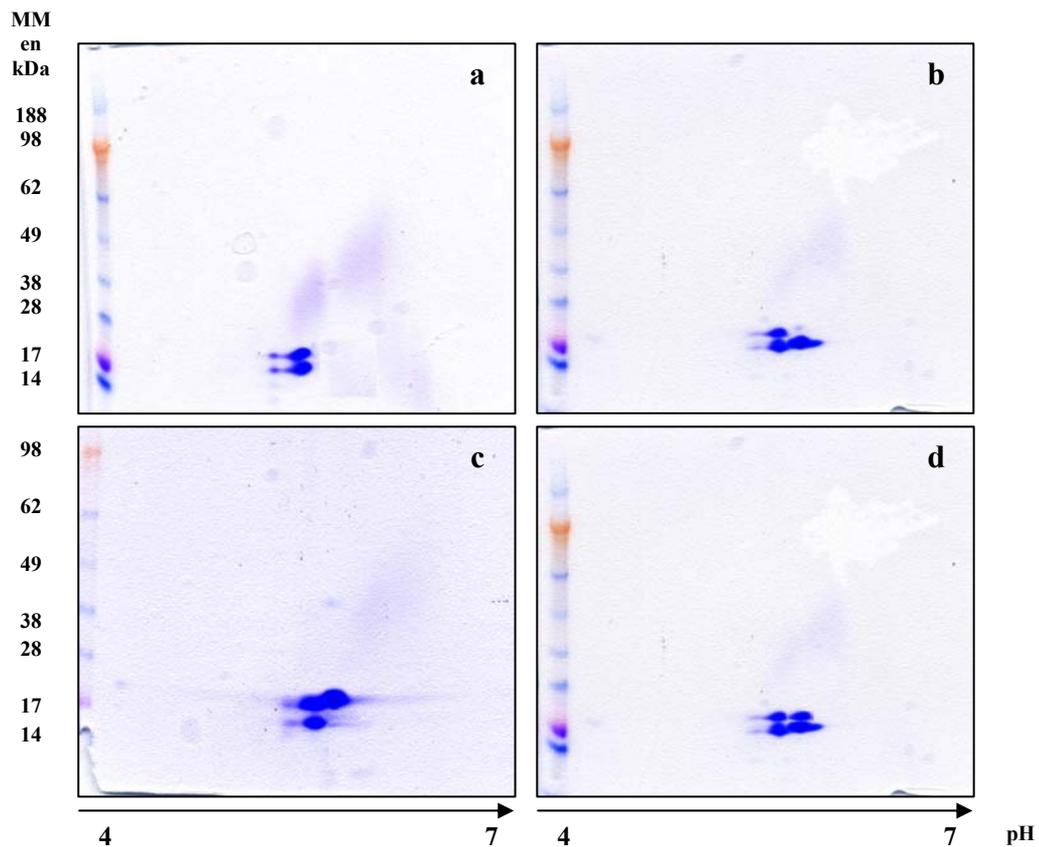
### **1. Polymorphismes des albumines 2S**

#### ***a) Caractérisation biochimique***

La purification des protéines a été réalisée selon la stratégie adoptée durant le premier chapitre. Toutefois, à la suite d'une seconde extraction des protéines de l'arachide, les méthodes chromatographiques menées dans des conditions analytiques plus résolutive nous ont permis de séparer différentes protéines de masse moléculaire proche de celle de l'allergène Ara h 2 isolé à l'origine. Deux fractions isolées présentent respectivement des protéines de 18045 Da et 16680 Da et une dernière fraction se caractérise par l'existence de protéines de 17735 Da et 16371 Da.

Le temps de rétention obtenu en phase inverse pour ces fractions, associé aux masses moléculaires déterminées par spectrométrie de masse suggère l'identification d'isoformes d'Ara h 2.

Enfin, les électrophorèses bidimensionnelles réalisées confortent l'identité des fractions purifiées.



**Figure 36 : électrophorèses bidimensionnelles reconstituées à partir des différentes isoformes d'Ara h 2 purifiées. (a) 17735 Da et 16371 Da ; (b) 17735 Da, 16371 Da et 16680 Da ; (c) 18045 Da, 17735 Da et 16371 Da ; (d) 18045 Da, 17735 Da, 16371 Da et 16680 Da.**

L'analyse électrophorétique de chaque fraction rend compte de la présence d'un nombre de spots équivalent à celui des masses mesurées. Aucun dédoublement de spot n'est observé pour une masse définie. La résolution de l'électrophorèse bidimensionnelle permet de distinguer des mélanges de fractions présentant des masses moléculaires proches (figure 36b à 36d). Le mélange des différentes fractions (figure 36d) reconstitue la disposition en carré précédemment décrite dans la figure 13 (page 56).

Récemment, il a été publié 4 séquences d'Ara h 2 (Hales et *al.*, 2004). Deux de ces séquences (Ara h 2.0201 et Ara h 2.0202) se distinguent par l'insertion d'une séquence de 12 acides aminés contenant l'épitope immunodominant DPYSPS.

```

                10      20      30      40
Ara h 2.0101 RQWELQGDRRCQSQLBRANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYE
Ara h 2.0102 *****
Ara h 2.0201 RQWELQGDRRCQSQLBRANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYG
Ara h 2.0202 *****

                50      60      70      80
Ara h 2.0101 RDPYSPSQDPYSPS-----PYDRRGAGSSQHQE
Ara h 2.0102 *****
Ara h 2.0201 RDPYSPSQDPYSPSQDPDRRDPYSPSPYDRRGAGSSQHQE
Ara h 2.0202 *****

                90      100     110     120
Ara h 2.0101 RCCNELNEFENNQRCMCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQF
Ara h 2.0102 *****
Ara h 2.0201 RCCNELNEFENNQRCMCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQF
Ara h 2.0202 *****

                130     140     150
Ara h 2.0101 KRELRLNPQQCGLRAPQRCDLEVESGGRDRY 6/10
Ara h 2.0102 *****E***** 1/10
Ara h 2.0201 KRELRLNPQQCGLRAPQRCDLEVESGGRDRY 2/10
Ara h 2.0202 *****D***** 1/10

```

Figure 37 : alignements formatés de la protéine mature dérivée des 10 clones d'Ara h 2 séquencés par Hales et al. (2004). Les substitutions d'acides aminés en position 40 (acide glutamique et glutamine) et en position 142 (acide aspartique et acide glutamique) sont en italiques. L'épitope immunodominant DPYSPS est surligné. Les astérisques indiquent les acides aminés identiques. Le nombre sur 10 est la proportion du clone parmi les 10 clones rapportés.

Entre les deux séquences d'Ara h 2.02 et les deux séquences d'Ara h 2.01, on observe une substitution d'acide aminé en position 142 d'un acide aspartique par un acide glutamique.

Les résultats et la discussion dans le premier chapitre avait traité de la présence d'une séquence surnuméraire de 12 acides aminés dans l'allergène clone Ara h 2.01 (Chatel et al., 2003). Cette séquence correspondant à une masse de 1431 Da coïncide avec la différence des masses moléculaires obtenues par spectrométrie de masse : 1365 Da entre 18045 Da et 16680 Da, et 1364 Da entre 17735 Da et 16371 D. Nous avons ainsi deux isoformes (18045 Da et 17735 Da) qui se distinguent des deux autres isoformes par l'insertion de la séquence « QDPDRRDPYSPS » (Chatel et al., 2003). Par contre, la différence de masse de 310 et 309 observée respectivement entre les isoformes de 18045 Da et 17735 Da et de 16680 Da et 16371 Da n'a ni été décrite ni expliquée à ce jour. La différence de masse est particulièrement accompagnée par une différence de pHi, comme relevé sur les électrophorèses. Des modifications importantes autres qu'une simple substitution (substitution multiple, délétions, modifications post-traductionnelles) induisant un changement significatif sont à envisager. Enfin, nous pouvons remarquer une différence de masse moléculaire entre nos isoformes et les masses estimées à partir des séquences des clones. Ce point reste pour le moment sans explication et sera discuté lors de la détermination des épitopes après hydrolyse de l'Ara h 2.

### b) Immunoréactivité des isoformes

L'existence de ces différentes isoformes constitue une opportunité intéressante pour évaluer l'impact de l'insertion d'une séquence comprenant un épitope immunodominant et des mutations ponctuelles sur la reconnaissance des allergènes par les IgE spécifiques.

L'immunoréactivité des isoformes d'Ara h 2 obtenues a été tout d'abord analysée par test ELISA direct à l'aide des 40 sérums de patients sélectionnés (figure 38).

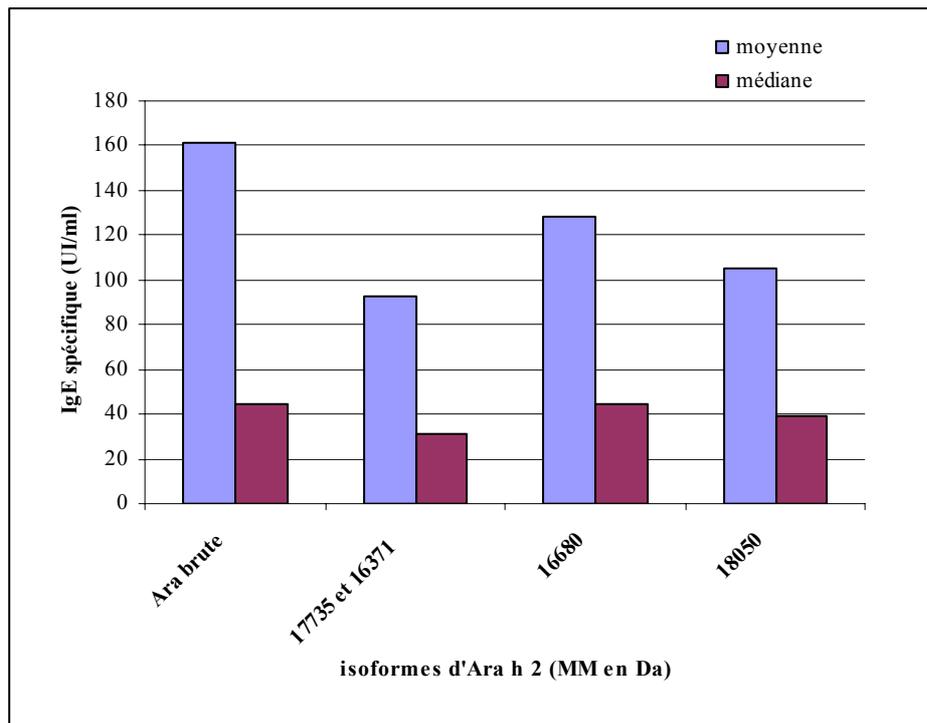


Figure 38 : immunoréactivité des différentes isoformes d'Ara h 2 purifiées à partir d'extrait d'arachides grillées. La réponse IgE spécifique est exprimée en  $UI.ml^{-1}$ . Moyenne et médiane réalisées sur 40 sérums. L'arachide grillée est utilisée comme référence de réponse des sérums à l'extrait brut.

Les réponses IgE spécifiques pour les différentes isoformes d'Ara h 2 sont proches et représentent chacune plus de 60% de la réponse IgE spécifique anti-arachide brute.

Pour l'arachide grillée, les isoformes de 18 kDa et 16 kDa ne présentent pas de différence d'intensité significative. La séquence surnuméraire n'induit pas une liaison plus importante des IgE puisqu'au contraire, l'isoforme privée de cette séquence engendre une réponse légèrement supérieure à celle contenant la séquence surnuméraire.

L'étude menée par test direct a été complétée à l'aide d'un test par compétition avec capture des IgE. Quatre sérums de notre population ont été retenus pour cette analyse (44 et 110 : patients de classes cliniques sévères, 190 et 496 : respectivement patients de classes cliniques nsp et modérée).

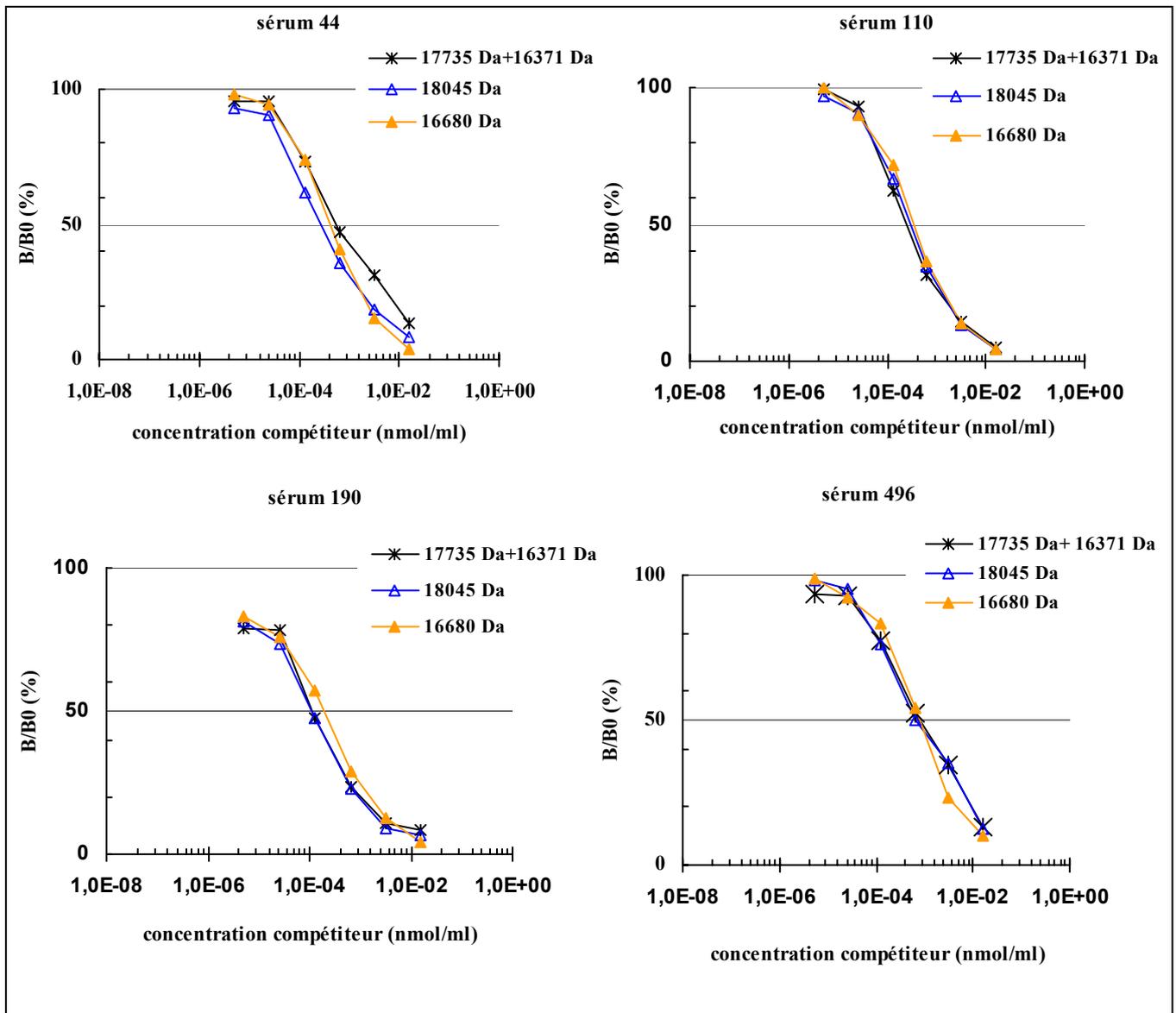


Figure 39 : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE par les isoformes d'Ara h 2 d'arachides grillées avec le format de compétition par capture des IgE. La concentration des compétiteurs est exprimée en nmol/ml et l'inhibition B/B0 en pourcentage.

Pour les 4 sérums, toutes les isoformes inhibent la liaison des IgE spécifiques à l'Ara h 2-AChE avec des courbes d'inhibition identiques. La concentration nécessaire pour inhiber 50% de la liaison IgE-Ara h 2-AChE est comprise entre 1 et 0,1 pmole.ml<sup>-1</sup>.

Ces résultats permettent de confirmer les observations précédentes : aucune différence d'immunoréactivité n'est observée entre les isoformes d'Ara h 2. Aussi, la séquence surnuméraire « QDPDRRDPYSPS » n'engendre pas une immunoréactivité plus importante de la protéine. L'immunoréactivité de l'allergène ne reposerait pas que sur cette séquence unique.

## **2. Effet de la réduction sur l'immunoréactivité des albumines 2S**

L'effet de la réduction suivie de la carboxyméthylation des allergènes Ara h 2 et Ara h 6 a été évalué par un test de compétition par capture des IgE dont les résultats sont représentés en figures 40 et 41 pour deux sérums représentatifs des tendances observées avec les deux traceurs Ara h 2-AChE et Ara h 6-AChE.

### ***a) Etude de l'inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE***

Dans les deux cas, des profils d'inhibition différents sont obtenus. Pour le premier sérum (clinique nsp), l'inhibition très forte obtenue avec Ara h 2 ( $IC_{50}$  de  $0,003 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) est peu diminuée avec la forme réduite ( $IC_{50}$  de  $0,009 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Par contre, le second sérum (clinique sévère) présente des courbes d'inhibition plus hétérogènes. La concentration de la forme réduite nécessaire à l'inhibition de 50% de la liaison des IgE est près de cent fois supérieure de celle de son équivalent natif.

Les inhibitions effectuées avec Ara h 6 permettent également de distinguer les résultats de ces deux sérums. En effet, pour le sérum « nsp », Ara h 6 native autant qu'Ara h 6 réduite permet une inhibition complète des liaisons des IgE à Ara h 2, alors que pour le sérum « sévère », seule la forme native aboutit à ce résultat dans une gamme de concentration employée. Enfin, à concentration équivalente de compétiteur, les inhibitions obtenues avec Ara h 6 native sont toujours inférieures à celles obtenues avec Ara h 2 native.

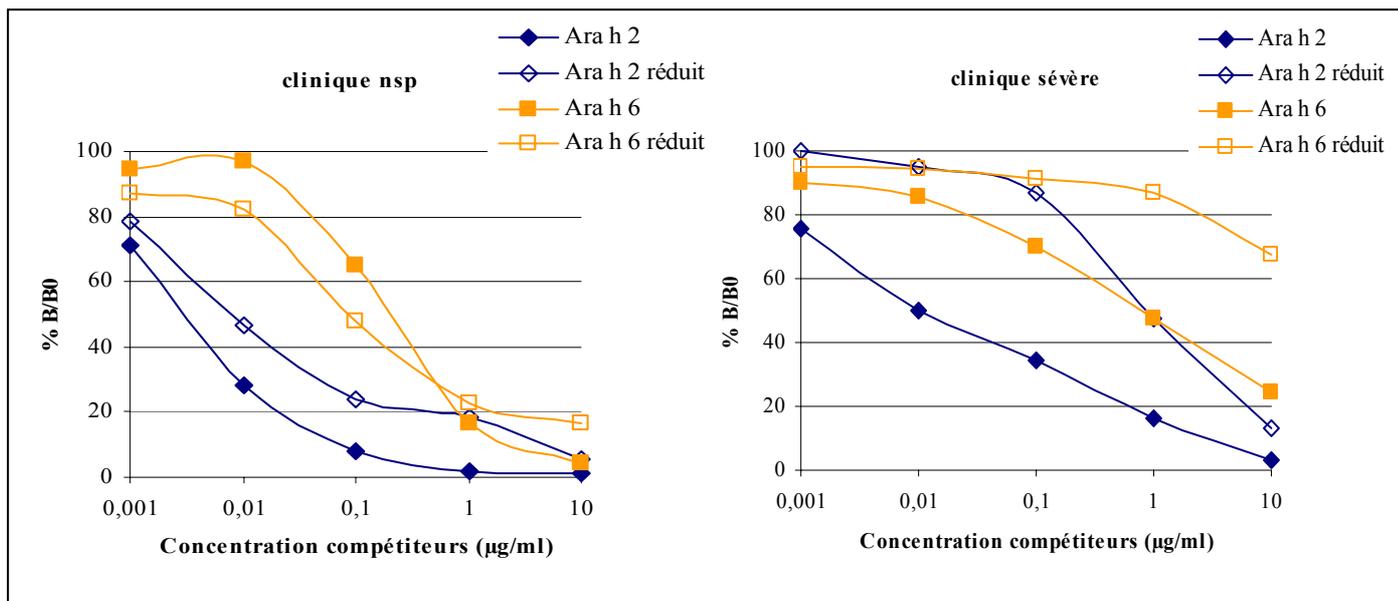


Figure 40 : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE par les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, natifs et réduits. La concentration des compétiteurs est en µg/ml et l'inhibition de la liaison B/B0 est exprimée en pourcentage. Deux sérums de classe clinique différente ont été utilisés.

### ***b) Etude de l'inhibition de la liaison IgE-Ara h 6-AChE***

Les mêmes analyses avec les mêmes sérums ont été effectuées avec le traceur Ara h 6-AChE (figure 41).

Les profils d'inhibition sont relativement proches pour les deux sérums. Après réduction, l'allergène Ara h 6 perd toute sa capacité d'inhibition de la liaison.

Nous avons également analysé les inhibitions de la liaison des IgE à Ara h 6 par l'allergène Ara h 2. Pour les deux sérums, nous obtenons des résultats similaires. L'allergène Ara h 2 natif présente une bonne inhibition de la liaison IgE-Ara h 6-AChE. Lorsque l'allergène Ara h 2 est réduit, cette capacité est fortement altérée. Les résultats montrent qu'Ara h 2 et Ara h 6 possèdent probablement des structures épitopiques linéaires communes mais plus accessibles dans Ara h 2. Ceci explique qu'après l'étape de réduction Ara h 2 puisse inhiber la liaison IgE-Ara h 6-AChE.

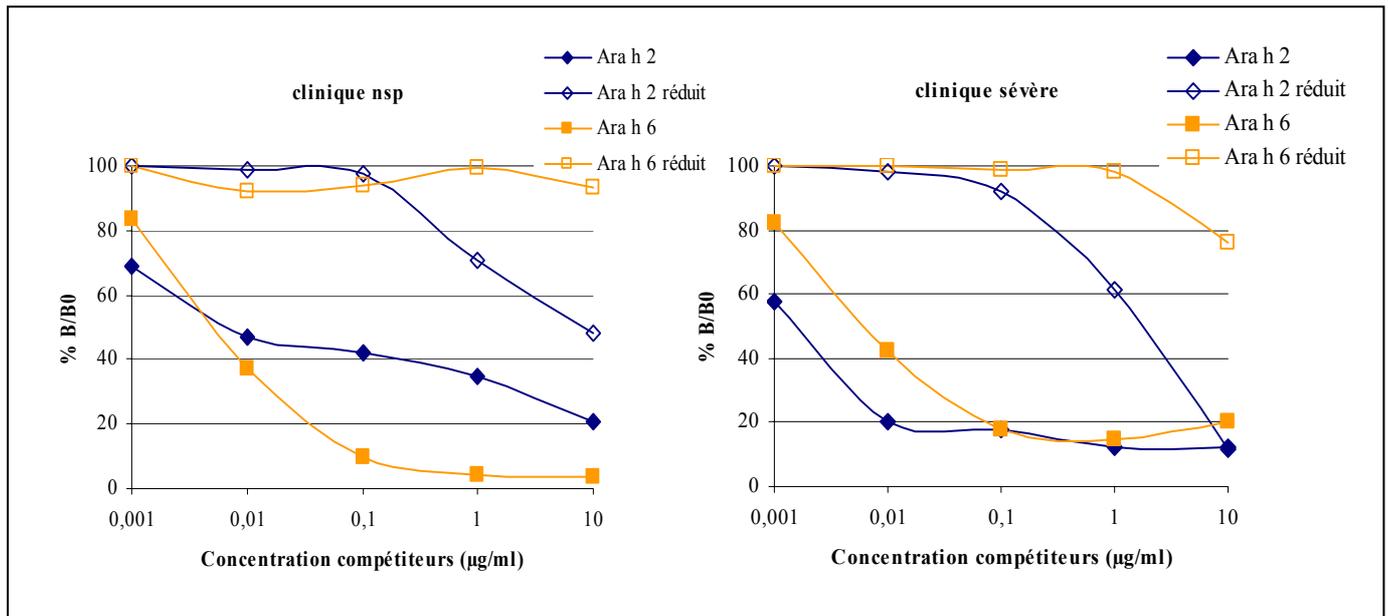


Figure 41 : Inhibition de la liaison IgE-Ara h 6-AChE par les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, natifs et réduits. La concentration des compétiteurs est en µg/ml et l'inhibition de la liaison B/B0 est exprimée en pourcentage. Deux sérums de classe clinique différente ont été utilisés.

Cette étude montre que le comportement immunoréactif d'Ara h 2 et d'Ara h 6 est différent. La réduction d'Ara h 2 et vraisemblablement son changement conformationnel induit une baisse de son immunoréactivité mais ne la supprime pas. L'implication d'épitopes concernant plus des séquences linéaires que des structures va être particulièrement étudiée lors de l'hydrolyse par la trypsine.

### 3. Etude de la résistance à l'hydrolyse trypsique de l'allergène Ara h 2 et étude de ses épitopes

#### a) Hydrolyse de l'allergène

Pour la digestion trypsique de l'allergène Ara h 2, nous avons utilisé un mélange de deux isoformes, une de 16 kDa et une autre de 18 kDa, qui présente la séquence surnuméraire contenant l'épitope potentiel DPYSPS. Nous espérons ainsi obtenir des peptides contenant deux fois l'épitope DPYSPS (pour l'isoforme de 16 kDa) ou des équivalents avec la séquence surnuméraire et possédant donc le motif DPYSPS répété trois fois (pour l'isoforme de 18 kDa).

L'hydrolyse a été étudiée à 1 h et arrêtée à 4 h, la séparation de ces 2 échantillons sur colonne en phase inverse (type C4) étant suivie par mesure d'absorbance à 230 nm et 280 nm.

L'allergène Ara h 2 avant digestion se présente sous un seul pic de temps de rétention de 62 minutes (figure 42).

Après une heure d'hydrolyse (figure 42), nous recensons 13 pics présentant un temps de rétention différent de la protéine initiale. Seules les fractions L et M ont un temps de rétention très proche de celui d'Ara h 2 et pourraient correspondre à la protéine non dégradée. Nous avons collectés 13 fractions (de A à M) correspondant à des pics ou des épaulements.

Après les quatre heures d'hydrolyse (figure 42), le profil chromatographique obtenu est différent de celui obtenu après une heure l'hydrolyse. La proportion des pics de temps de rétention inférieur à 50 minutes a augmenté et plus aucun pic pouvant correspondre à Ara h 2 natif n'est observé. Nous avons collecté 13 fractions (de a à m) correspondant à des pics ou des épaulements. L'allergène Ara h 2 ne présente pas de résistance importante à l'hydrolyse par la trypsine dans nos conditions (ratio 1/400, p/p, température 37°C, pH 8,5).

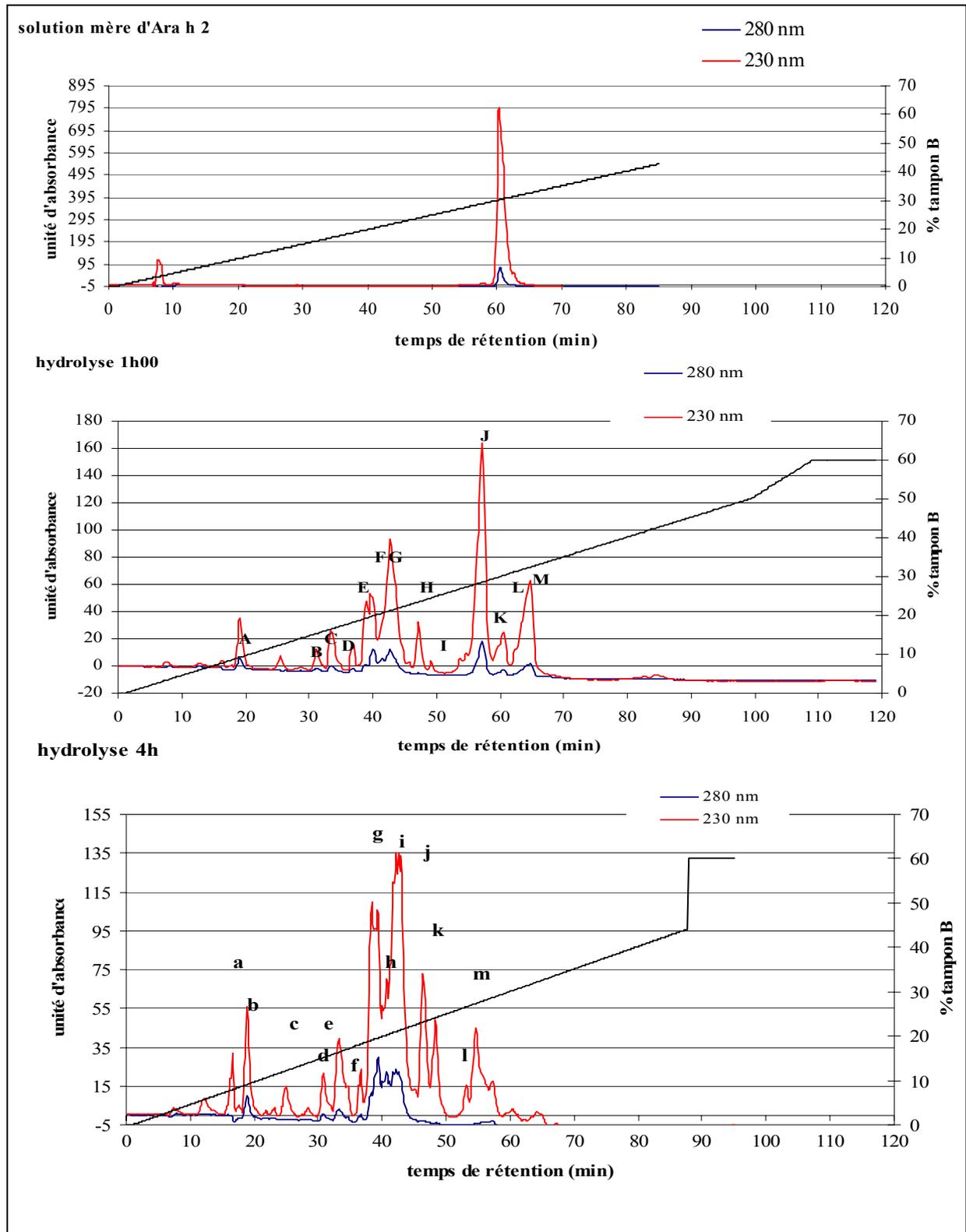


Figure 42 : chromatogramme (colonne phase inverse) de l'hydrolyse trypsique d'Ara h 2 après 1h00 et 4h00 à 280 nm et 230 nm. Le gradient en tampon B est symbolisé par la ligne continue noire. Les gradients sont identiques dans les 3 cas.

Compte tenu de la complexité peptidique (nombreux pics et épaulements) et de la faible résolution du système chromatographique, nous avons décidé d'achever la purification pour certaines fractions sur un second système (colonne analytique mixte en phase inverse de type C2/C18) et tampons acétate (pH 6,8): M, g+h, i, j, k, l, m. Les entités obtenues après cette étape sont répertoriées dans le tableau suivant. Tous les chromatogrammes qui correspondent à ces purifications sont présentés en annexe.

**Tableau 22 : fragments peptidiques obtenus à la suite de la deuxième purification sur colonne en phase inverse C2/C18. Les lettres correspondent à la dénomination des fractions collectées lors de la première purification (colonne type C4).**

Purification C4	Purification C2/C18	
	Nbre de fractions collectées	Temps de rétention
M	1	40'39
g+h	3	10'94
		21'26
		24'44
i	4	12'15
		14'34
		21'06
		22'37
j	1	27'60
k	3	28'00
		29'57
		35'21
l	2	29'78
		31'10
m	1	29'54

Du fait de la faible quantité estimée pour certains peptides (inférieur à 100 µg), seules neuf fractions ont été conservées pour les analyses de la réponse IgE spécifique.

Les profils obtenus pour les différents chromatogrammes de phase inverse sur colonne C2/C18 montrent une bonne résolution lors de la séparation et donc une pureté correcte de nos entités. Le séquençage des acides aminés amino-terminaux fournit soit une seule séquence soit plusieurs séquences bien définies. Ces résultats associés à la détermination des masses des peptides par spectrométrie de masse MALDI TOF en conditions réductrices ou non, nous ont permis de valider la pureté des fractions, certaines étant constituées de fragments reliés par des ponts disulfures, et d'attribuer une séquence à ces fragments. Les fractions retenues et caractérisées pour la suite des analyses sont répertoriées dans le tableau 4.

**Tableau 23 : caractérisation des peptides générés au cours de l'hydrolyse par séquençage des acides aminés N-terminaux et par détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse. Les cystéines pouvant intervenir dans les ponts disulfures sont indiquées en rouge. Les acides aminés permettant de discriminer la séquence d'origine du peptide, à savoir Ara h 2.02 (18 kDa) ou Ara h 2.01 (16 kDa), sont indiqués en bleu. Les prolines de certains acides aminés sont hydroxylées.(\*) la cystéine n'a pas pu être séquençée car elle est trop éloignée dans la séquence du peptide mais elle intervient dans les ponts disulfures avec les autres peptides.**

entités	Masse moléculaire (Da)	Acides aminés N-terminaux	Position séquence Ara h 2.02	Origine Ara h 2.01	remarques
initial	18050/ 16640	RQQWELQGDRRXQSQ	22-171	Non	Pas de peptide signal
L	1567.8 2316.5 4986.5 2526.8	ANLRP <b>CE</b> QHLMQK RQQWELQGDRR <b>C</b> QSQL GAGSSQHQR <b>CC</b> NELN NLPQQCGLRAPQR <b>CDL</b>	40-55 22-39 93-131 147-169	Oui	4 peptides liés par des ponts disulfures
M	1567.8 2316.5 4986.5 2798.1 2499.8	ANLRP <b>CE</b> QHLMQK RQQWELQGDRR <b>C</b> QSQ GASSQHQR <b>CC</b> NEL NLPQQ <b>CGL</b> RAPQR <b>CD</b> QQEQQFKRELRLNPQ..... <b>C*</b> ..	30-52 22-39 93-131 147-171 137-155	Oui	5 peptides liés par des ponts disulfures
g+h 10'94	3067.04	DEDSYGRDPYSXSQDPYSXSQDPDRR	56-81	Non	X : Proline hydroxylée
g+h 24'44	1470.74	RQQWELQGDRR	22-32	Non	-
i 12'15	3056.06	DEDSYERDPYSXSQDPYSXS <b>PY</b> DRR	56-75+88-92	Oui	X : Proline hydroxylée
i 14'34	3054.06 3295.35	DEDSYERDPYSXSQDPYSXS <b>PY</b> DRR IQRDEDSYERDPYSXSQDPYSXS <b>PY</b> DRR	56-75+88-92 53-75+88-92	Oui Oui	X : P hydroxylée
j 27'60	2649.1 1566.1 1027.52	GAGSSQHQR <b>CC</b> NELNEFENNQR ANLRP <b>CE</b> QHLMQK NLPQQ <b>CGL</b> R	93-115 40-52 147-155	Oui/non	3 peptides liés par des ponts disulfures
k 29'57	1566.77 1027.57 1611.64	ANLRP <b>C</b> QHLMQK NLPQQ <b>CGL</b> R <b>CC</b> NELNEFENNQR	40-52 147-155 103-115	Oui/non	3 peptides liés par des ponts disulfures
l 31'10	1897.8 1515.71 862.4	<b>CM</b> CEAQQIMENQSDR APQR <b>CDL</b> DVESGGR <b>C</b> QSQLER	116-131 156-169 33-39	Oui	3 peptides liés par des ponts disulfures

De plus, nous avons pu positionner les différents peptides sur la séquence d'Ara h 2.02 (AAN7576). Pour certains des peptides, il a été possible de discriminer les peptides provenant de l'allergène Ara h 2.02, contenant une séquence surnuméraire, de ceux de l'allergène Ara h 2.01 (tableau 23 et figure 43). Sur l'alignement des séquences des peptides effectué par rapport à l'isoforme 18045 Da, les peptides i 12'15 et i 14'34, présente une séquence déletée. En effet, issu de l'isoforme à 16680 Da, ils sont donc privés de la séquence surnuméraire « QDPDRRDPYSPS ». En utilisant les structures schématiques des albumines 2S (Mills et Shewry, 2004) présentées page 33 (figure 8), nous avons pu identifier les ponts disulfures sur les peptides impliqués dans les associations entre peptides d'une même fraction.

---

Les fragments générés permettent de recouvrir la séquence entière de l'allergène Ara h 2 (figure 43).

Cinq fractions sont ainsi des complexes de peptides de taille variable associés entre eux par des ponts disulfures. Les fractions L et M présentent une forte homologie puisqu'elles comportent 3 peptides identiques (1567.8, 2316.5, 2526,8 et 4986.5 Da) associés par au moins 3 ponts disulfures. Ces associations permettent de recouvrir une grande partie de la séquence d'Ara h 2. Les seules séquences perdues correspondent à une région carboxy-terminale de 9 à 11 acides aminés et à une partie amino-terminale comprenant le motif répété DPYSPS.

Deux autres fractions (j 27'60 et k 29'57) présentent elles aussi une association de trois peptides reliées par deux ponts disulfures. Chacun de ces trois peptides constitue une forme délétée des fragments trouvés pour les peptides des fractions L et M. La masse moléculaire des peptides se réduit alors à 1 ou 2 kDa. Le dernier complexe l 31'10 est également une association de trois peptides mais avec des séquences différentes de celles trouvées pour j 27'60 et k 29'57 et complémentaires par rapport à L et M.

Quatre fractions correspondent à des peptides dépourvus de pont disulfure. La fraction g+h 24'44 couvre la séquence N-terminale de la protéine, sans le peptide signal de la séquence d'Ara h 2.02 (AAN7576). Une deuxième fraction g+h 10'94 correspond partiellement à la séquence perdue par les complexes L et M notamment, les peptides i 12'15 et i 14'34 étant les équivalents pour l'isoforme de 16670 Da.

Une caractéristique nouvelle, non décrite à ce jour pour la séquence d'Ara h 2, est l'existence de prolines hydroxylées dans les fragments précédemment cités. Toutes les analyses des séquences d'Ara h 2, décrites dans la littérature, résultent de protéines recombinantes. L'hydroxylation des prolines fait partie des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent pas se produire dans des systèmes bactériens (procaryotes). Ce phénomène d'hydroxylation des prolines existe dans des algues vertes, des monocotylédones, des dicotylédones comme les glycoprotéines du soja (Ferris et *al.*, 2001) (Hoon et *al.*, 1998). Pour ces glycoprotéines, il a été établi qu'un domaine PPSPX où les prolines ont de fortes chances d'être hydroxylées, peut servir de code de glycosylation pour l'addition de sucres à la séquence protéique. Des protéines d'origine animale comme le collagène possèdent des prolines hydroxylées qui permettent de rigidifier leur structure.

Par ailleurs, Petersen et *al.* (1998) ont suggéré que les modifications post-traductionnelles de l'allergène majeur du pollen de l'herbe vert, Phl p 1, notamment l'hydroxylation des prolines,

participent à la réactivité IgE de la partie amino-terminale de l'allergène. Les deux hydroxyprolines de l'allergène (position 5 et 8) peuvent provoquer une augmentation de la réactivité IgE. En effet, 3,3 % des sérums se lient exclusivement aux peptides comportant les hydroxyprolines tandis que 0,4% se lient au peptide contenant à ces deux mêmes positions (5 et 8) des prolines. Les hydroxyprolines retrouvées dans Ara h 2 sont localisées dans une région contenant un épitope immunodominant, ce qui pourrait laisser envisager un rôle de l'hydroxylation dans l'immunoréactivité de cette région. L'hydroxylation de ces deux prolines est une explication à la différence de masse moléculaire observée entre les entités Ara h 2 recombinantes décrites dans la littérature (Chatel et al., 2003; Hales et al., 2004) et celles que nous avons purifiées (page 126 du chapitre 2).

A partir des résultats répertoriés dans le tableau, nous avons réalisé l'alignement des différentes séquences sur celle d'Ara h 2 (figure 43).

## Chapitre 2 : identification d'épitopes des allergènes de la famille des globulines 11S et des albumines 2S

### Ara h 2 (positionnement par rapport à la séquence d'Ara h 2.02)

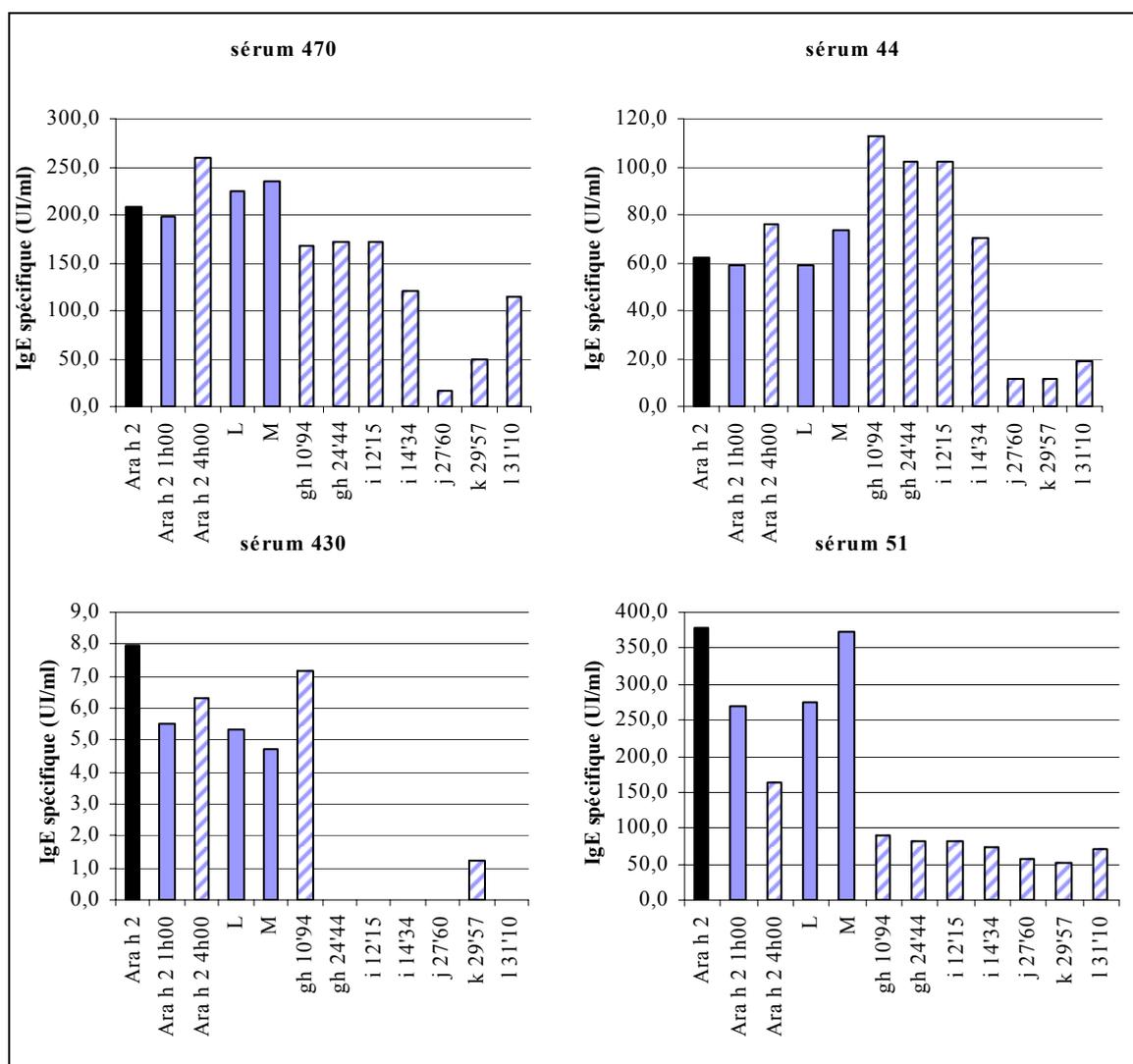


Figure 43 : alignement des séquences peptidiques obtenues à la suite de l'hydrolyse d'Ara h 2 par la trypsine. (-) : déletion d'acides aminés par rapport à la séquence d'Ara h 2 initiale.

**b) Immunoréactivité de l'allergène Ara h 2 au cours de l'hydrolyse et détermination des régions épitopiques**

**(i) Evaluation de l'immunoréactivité par ELISA direct**

L'immunoréactivité des différents fragments obtenus à la suite de l'hydrolyse a été évaluée par ELISA à l'aide de 20 sérums de patients allergiques représentatifs de notre population (cliniques légère (4), modérée (7), sévère (6), nsp (3)). Nous avons obtenu quatre profils type de réponse parmi les 20 sérums testés (figure 44).



**Figure 44 : immunoréactivité des fragments d'hydrolyse d'Ara h 2 purifiés. La réponse IgE spécifique est exprimée en UI/ml. Quatre profils de réponse obtenus parmi les 20 sérums testés. La réponse IgE obtenue avec la solution mère avant digestion est symbolisée en noir, avec la solution d'hydrolyse à 1h ainsi que les fractions issues de cette hydrolyse 1h en bleu, avec la solution d'hydrolyse à 4h ainsi que les fractions issues de celle-ci en hachuré bleu.**

Quatre vingt pour cent des sérums testés (soit 16 sérums) présentent le profil du sérum 470 et du sérum 44, sans distinction de classe clinique. La réponse IgE spécifique anti-Ara h 2 n'est pas diminuée par l'heure d'hydrolyse et bien au contraire, certains sérums ont une réponse IgE accrue à l'encontre d'Ara 2 après quatre heures d'hydrolyse (sérums 470 et 44). Pour tous ces sérums, toutes les entités sont reconnues par les IgE des patients, les fractions j 27'60 et k 29'57 présentant la plus faible immunoréactivité. Le sérum 44 présente une liaison IgE plus accentuée pour les fractions g+h 10'94, i 12'15 et i 14'34 qui incluent la séquence DPYSPS ainsi que le peptide amino-terminal (g+h 24'44). Mais, l'immunoréactivité de ces sérums n'est pas uniquement portée par ces régions décrites par Stanley *et al.* (1997).

Les profils obtenus pour 20% des sérums sont proches de ceux des sérums 430 et 51. Après une heure d'hydrolyse, l'immunoréactivité est bien conservée. Par contre, après 4 heures de traitement, l'immunoréactivité de l'échantillon d'Ara h 2 hydrolysé est fortement diminuée pour le sérum 51 et semble répartie sur tous les fragments. Pour le sérum 430, il semblerait que seule la fraction g+h 10'94 conserve une immunoréactivité importante, ce fragment recouvrant la région D56-R81 qui contient la triple répétition du motif DPYSPS.

***(ii) Etude de l'immunoréactivité par dosage par compétition avec capture des IgE***

Les résultats obtenus par ELISA direct ont été confirmés à l'aide de tests par compétition avec capture des IgE. Six fractions purifiées issues de l'hydrolyse d'Ara h 2 sont utilisées pour déplacer la liaison IgE-Ara h 2-AChE et trois fractions « redondantes » sont écartées : la fraction i 14'34 qui couvre la même séquence que la fraction i 12'15, la fraction M, peut différente de la fraction L, la fraction k 29'57 qui correspond pratiquement à la fraction j 27'60.

Nous avons réalisé le dosage par compétition avec les sérums utilisés précédemment pour le dosage direct. Nous ne présentons les résultats que pour deux sérums (figures 45 et 46), présentant un comportement divergent lors du dosage direct. La gamme de compétiteurs est exprimée en nanomoles par millilitre afin de pouvoir comparer des entités de masse moléculaire très différente : Ara h 2 à environ 18000 Da et g+h 24'44 à 1470 Da, par exemple.

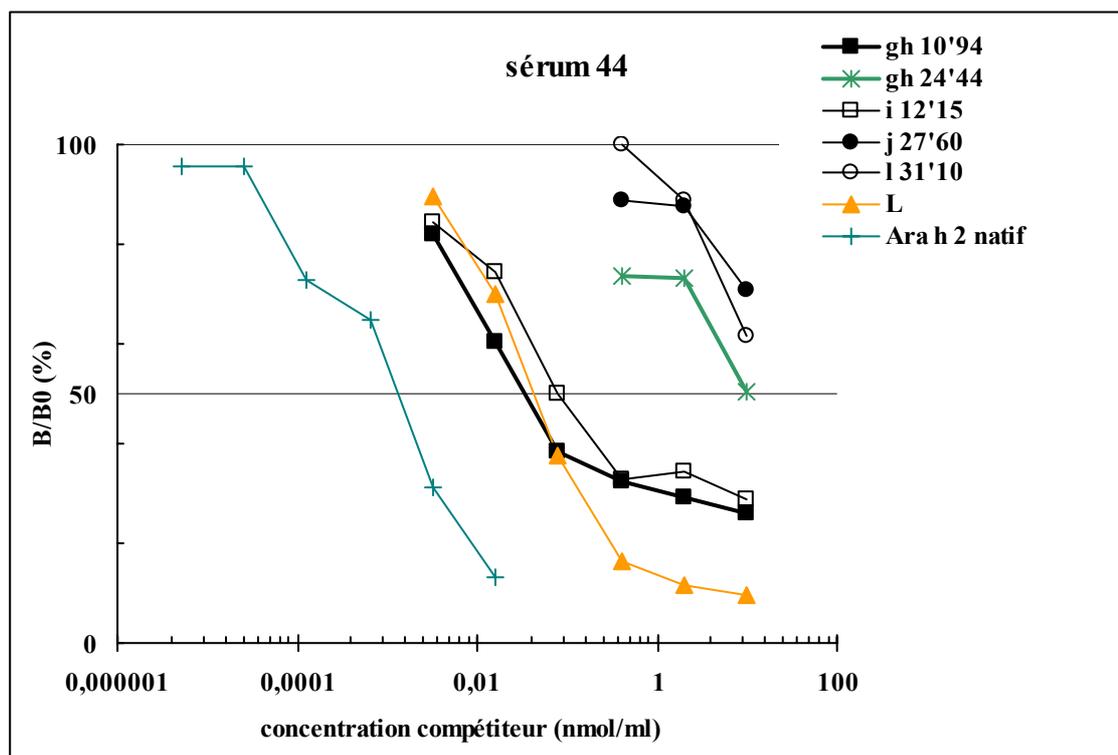


Figure 45 : inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-ACHé par les fractions d'hydrolyse d'Ara h 2 purifiées. La concentration des compétiteurs est exprimée en nmol/ml et l'inhibition B/B0 est exprimée en pourcentage.

Pour le sérum 44, tous les peptides déplacent significativement la liaison IgE-Ara h 2-ACHé (figure 45). Contrairement aux résultats obtenus lors du test ELISA direct, Ara h 2 se démarque des fractions d'hydrolyse et présente une meilleure inhibition. Les fractions présentent des courbes parallèles à celle obtenue avec Ara h 2 mais avec une sensibilité inférieure : la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la liaison (IC50) est supérieure d'au moins 2 unités logarithmiques pour les fractions d'hydrolyse.

Parmi les fractions testées, deux groupes se distinguent par leur capacité d'inhibition. Le premier groupe est constitué des fractions L, i 12'15 et g+h 10'94. Leurs courbes d'inhibitions sont bien parallèles à celle d'Ara h 2 mais l'IC50 est supérieure, ce qui traduit une capacité

d'inhibition moins importante. Les fractions i 12'15 et g+h 10'94 couvrent la région contenant le motif DPYSPS et complémentaire des structures présentées par la fraction L. Dans ce même groupe « d'inhibition », la spécificité des IgE engagées n'est pas identique et l'immunoréactivité d'Ara h 2 semble partagée par différentes régions impliquées par les fractions i 12'15 et g+h 10'94, et L. Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus par le dosage direct. Le deuxième groupe « d'inhibition » est constitué par les fractions g+h 24'44 (peptide amino-terminal : R22-R32), j 27'60 et l 31'10 (deux fractions complémentaires de L). Ces fractions déplacent plus difficilement la liaison IgE-Ara h 2-AChE. Elles conservent tout de même une immunoréactivité significative qui a également été retrouvé lors des tests ELISA direct. Une seule discordance est observée entre le test ELISA direct et par compétition. Elle concerne la fraction g+h 24'44 qui présente une inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE difficile alors que le signal en ELISA était tout aussi important que les fractions L, g+h 10'94 et i 12'15. Les IgE spécifiques peuvent reconnaître cette séquence peptidique, une fois immobilisée notamment, mais il est possible que la proportion d'IgE spécifique dirigée contre cet épitope soit négligeable par rapport aux IgE spécifiques dirigées contre les autres épitopes d'Ara h 2.

Nous avons procédé à la même analyse des fractions d'hydrolyse d'Ara h 2 par compétition avec le sérum 51 dont le profil de réponse par ELISA direct était différent du sérum précédent.

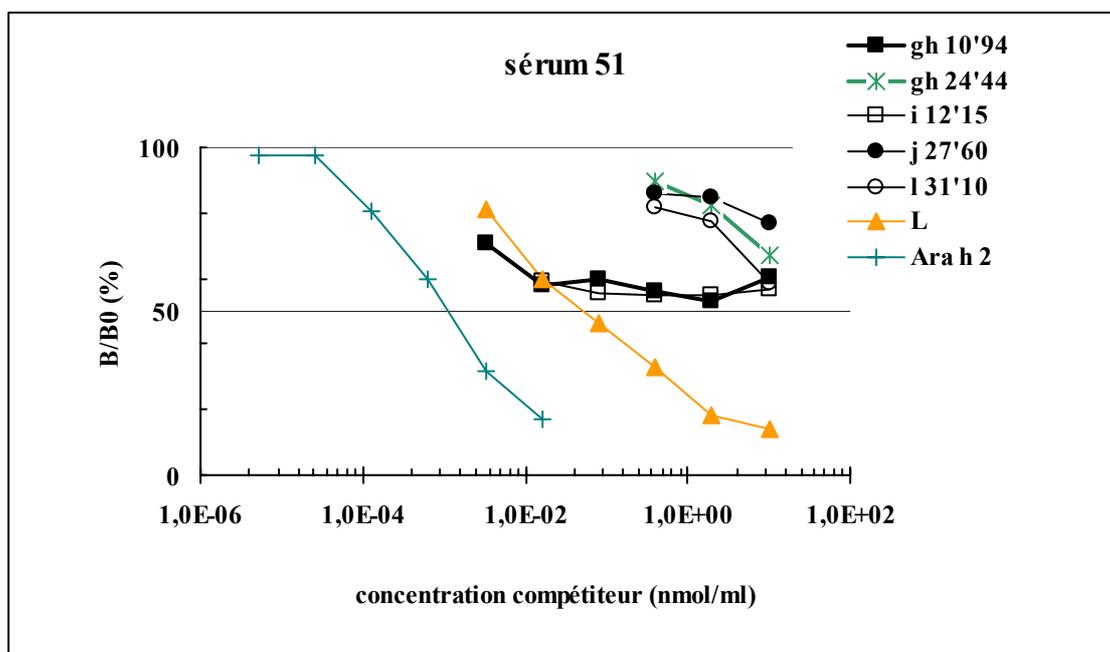


Figure 46 : inhibition de la liaison IgE-Ara h 2-AChE par les fractions d'hydrolyse d'Ara h 2 purifiées. La concentration des compétiteurs est exprimée en nmol/ml et l'inhibition B/B0 est exprimée en pourcentage.

Les courbes d'inhibition obtenues pour le sérum 51 sont représentées en figure 46. Les déplacements obtenus avec les peptides sont plus faibles que ceux obtenus avec Ara h 2 natif. Pour ce sérum, nous observons trois groupes de profil d'inhibition. La fraction L, très bien reconnue lors des tests directs, présente une courbe d'inhibition parallèle à celle d'Ara h 2 mais décalée de deux unités logarithmiques. Le deuxième groupe est le même que celui présenté pour le sérum 44 et est constitué des fractions g+h 24'44, j 27'60 et l 31'10. Ces fractions, faiblement reconnues lors du test ELISA direct, déplacent qu'une partie des liaisons IgE-Ara h 2-AChE. Le troisième profil d'inhibition est constitué des fragments g+h 10'94 et i 12'15 qui, présentent un déplacement parallèle à celui observé pour la fraction L. Cependant, quelque soit la concentration, les peptides ne déplacent pas plus de 40% des liaisons IgE-Ara h 2-AChE. Le sérum 51 diffère donc du sérum 44 et présente une réponse IgE spécifique essentiellement dirigée contre les peptides des fractions L. La capacité de liaison des fractions g+h 10'94 et i 12'15 est moins importante.

### **c) Conclusion**

A la suite des analyses d'immunoréactivité des fractions d'hydrolyse d'Ara h 2, nous pouvons conclure que même après 4h d'hydrolyse trypsique, l'allergène conserve une immunoréactivité importante malgré une dégradation de l'entité naturelle. Les résultats du test ELISA direct, montre la capacité de reconnaissance des peptides par les IgE spécifiques. Les résultats du test par compétition soulignent la diversité des sites épitopiques d'Ara h 2. Pour chaque patient étudié, l'immunoréactivité repose sur un grand nombre de régions peptidiques. La séquence DPYSPS décrite comme immunodominante par Stanley et *al.* (1997) est, probablement, impliquée puisque localisé dans une région fortement immunoréactive dans les expériences effectuées avec notre population de sérums de patients allergiques, mais la répétition de ce motif au sein d'une séquence surnuméraire ne semble pas induire de différence d'allergénicité entre isoformes, contrairement à ce qui avait été préalablement suggéré (Chatel et *al.*, 2003). L'immunoréactivité de l'allergène ne repose donc pas majoritairement sur cette région et les IgE d'un des sérums étudiés ne présentent pas la meilleure affinité apparente pour cette région de l'allergène contenant le fragment DPYSPS, caractérisé comme immunodominant par Stanley et *al.* (1997). Les IgE reconnaîtraient un ensemble de peptides liés par des ponts disulfures, à savoir les peptides A40-R55, R22-R39, G93-R131, N147-R169, ce qui soulignerait l'importance de la conformation dans la

reconnaissance antigène-anticorps. Une étude récente montre que l'épitope 27-36 (DRRCQSQLER) est reconnue par 60 à 73% des patients avec une allergie symptomatique à l'arachide et par seulement 6% des individus sensibilisés mais tolérants à l'arachide (Beyer et *al.*, 2003). Le peptide G93-R131 fait partie de la région hypervariable retrouvée dans toutes les albumines 2S et constitue une région antigénique (cf. introduction page 36), sans pour autant avoir été décrit comme épitope par Stanley et *al.* (1997). Nos résultats sont donc pour une partie discordants avec ceux publiés par Stanley et *al.* (1997) qui ont travaillé sur des peptides synthétiques de l'allergène. Ces peptides ne contiennent pas les éventuelles modifications post-traductionnelles comme notamment l'hydroxylation des prolines que nous avons pu mettre en évidence grâce au séquençage de notre allergène purifié. L'existence de l'hydroxyproline dans la séquence d'Ara h 2 et dans aucune autre protéine de l'arachide n'a jamais été décrite. Il nous reste à établir le rôle exact des hydroxyprolines dans une région fortement immunoréactive. Par ailleurs, l'étude des épitopes à partir de peptides de synthèse ne permet le plus souvent qu'une approche des épitopes linéaires. Or, nos travaux ont montré que la conformation induite par les ponts disulfures semble tenir un rôle important dans l'allergénicité d'Ara h 2. Le clivage par la trypsine produit des peptides qui restent liés par les ponts disulfures. Ainsi, les fractions R22-R39, A40-R55, G93-R131, N147-R169 présentent une immunoréactivité tout aussi importante que le peptide D56-R81. De plus, si pour cette fraction, certains peptides sont tronqués tout en restant liés par des ponts disulfures (A40-K52, G93-R115, C103-R115, N147-R155, A156-R159), l'immunoréactivité est diminuée. En combinant les résultats d'immunoréactivité obtenus pour toutes les fractions, il est possible d'apporter de hypothèses sur les régions reconnues par les IgE. En effet, la région amino-terminale (R22-K52) d'Ara h 2 est uniquement retrouvée dans les fractions L et M, reconnues par les IgE. Or, la fraction g+h 24'44 (R22-R32) est peu immunoréactive. L'immunoréactivité semble donc peu portée par les acides aminés amino-terminaux. De même, la région G93-R131 (fractions L et M) est partiellement retrouvée dans des fractions peu ou pas reconnues par les IgE spécifiques : G93-R115 (j 27'60), C103-R115 (k 29'57) et C116-R131 (l 31'10). Il est envisageable que les IgE reconnaissent des épitopes dont les séquences peptidiques s'étendent sur ces 3 fragments décrits précédemment (G93-R131) ou sur la partie amino-terminale (R22-K52). Il est également possible que la conformation engendrée par les ponts disulfures rapproche des séquences peptidiques reconnues alors par les IgE ; ces séquences étant tronquées pour les fractions j 27'60, k 29'57 et l 31'10.

## C. CONCLUSION GENERALE

La seconde partie de ce manuscrit s'inscrit dans la suite logique de l'étude du répertoire des allergènes de l'arachide. Nous avons approfondi l'étude de la spécificité des IgE à partir de deux modèles différents, un membre de la famille des globulines 11S et un membre de la famille des albumines 2S.

Dans le cas du premier modèle, nous avons profité de la protéolyse naturelle de la globuline 11S qui génère différents peptides localisés sur toute la longueur de la protéine. Il nous a été possible de distinguer des régions fortement reconnues par les IgE de régions plus faiblement reconnues, notamment une partie « centrale » ainsi qu'à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. L'étude de la reconnaissance de ces différents peptides de l'allergène Ara h 3 à l'aide de sérums de classes cliniques différentes n'a pas permis de distinguer de profil de réponse différent en fonction de la classe clinique.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer les spécificités des IgE aux albumines 2S. Dans ce cadre, nous avons étudié l'effet de conditions réductrices sur l'immunoréactivité des albumines 2S de l'arachide, Ara h 2 et Ara h 6. Nous avons relevé des différences dans la réponse IgE entre Ara h 2 et Ara h 6. La réduction d'Ara h 6 entraîne une perte de la reconnaissance des IgE. Les épitopes de cet allergène sont donc fortement conformationnels, la structure étant dépendante des ponts disulfures. L'immunoréactivité d'Ara h 2 apparaît plus contrastée et n'est pas supprimée après réduction. Certaines régions « déstructurées » peuvent être reconnues par les IgE. Nous devons également souligner l'existence de réactions croisées. Des structures épitopiques linéaires sont communes à Ara h 6 et Ara h 2 ce qui explique que l'allergène Ara h 2 puisse inhiber la liaison IgE-Ara h 6-AChE et réciproquement. Nous avons envisagé l'étude des épitopes de l'allergène Ara h 2 par une hydrolyse enzymatique sans réduction préalable. Tout en préservant une certaine structure, nous avons ainsi conservé une réponse IgE dirigée contre des fragments isolés ou maintenus par leurs ponts disulfures. Il nous a été possible d'analyser la séquence peptidique immunodominante DPYSPS (Stanley et *al.*, 1997) et d'évaluer son fort potentiel immunoréactif. Bien que cet épitope se trouve dans une région fortement immunoréactive, la répétition supplémentaire de ce motif dans l'isoforme de 18045 Da n'entraîne pas un gain d'immunoréactivité et donc de la reconnaissance des IgE en comparaison avec l'isoforme de 16680 Da. Autant par les tests ELISA direct que par les analyses par compétition, nous avons pu observer que l'immunoréactivité d'Ara h 2 était répartie tout le long de la séquence

protéique et que certains sérums présentaient une spécificité de réponse pour des régions distinctes de la région contenant la séquence immunodominante DPYSPS. L'allergène Ara h 2 ne présente pas au cours de cette expérience de résistance importante à l'hydrolyse contrairement aux résultats d'Astwood et *al.* (1996) et de Sen et *al.* (2002). Nous pouvons tout de même noter que Fu et *al.* (2002) et Thomas et *al.* (2004) observaient une dégradation d'Ara h 2 mais dans un fluide gastrique simulé et en présence de pepsine. Notre approche souligne l'importance de l'étude de l'effet de la digestion gastro-duodénale sur l'allergénicité de l'arachide, et plus particulièrement l'étude d'une immunoréactivité conservées par les peptides libérés à la suite de l'hydrolyse par les enzymes digestives.

Avec les résultats obtenus, nous avons pu observer que les modifications post-traductionnelles simples ont fréquemment lieu au sein des protéines végétales, notamment l'arachide. Certains travaux ont décrits la présence d'hydroxyprolines dans certains végétaux tels que le soja, le pollen de l'herbe verte (Petersen et *al.*, 1998) (Ferris et *al.*, 2001) (Hoon et *al.*, 1998). Pour cette dernière il a été établi que les modifications post-traductionnelles simples peuvent altérer la réactivité IgE des allergènes et des peptides courts. Cette observation devrait être prise en compte, lorsque les allergènes recombinants sont utilisés pour le diagnostic et l'immunothérapie.

En conclusion, l'immunoréactivité de chaque protéine, une isoforme d'Ara h 3 et Ara h 2 représentant les familles respectives globuline 11S et albumine 2S, n'est pas portée par une seule région. Pour l'isoforme d'Ara h 3, au moins deux régions majeures (110-207 et la région C-terminale) sont impliquées dans l'immunoréactivité de l'allergène. Pour Ara h 2, plusieurs structures sont impliquées dont notamment la région contenant le motif DPYSPS. Des modifications ainsi que des hydrolyses naturelles ou provoquées ne suffisent pas à « détruire » l'immunoréactivité des deux modèles évoqués. Ainsi, des fragments relativement « courts » peuvent être reconnus par les IgE. Cette remarque va faire l'objet du dernier chapitre de ce manuscrit à savoir, l'étude des modifications induites par des procédés thermiques ainsi que la digestion *in vivo* ou simulée *in vitro* et de leur influence sur l'immunoréactivité résiduelle de l'arachide et d'un de ses allergènes isolé.

Au cours des deux premiers chapitres de ce manuscrit, nous avons identifié la majorité des protéines responsables de l'allergénicité de l'arachide. L'analyse de la spécificité des IgE nous a permis de caractériser la structure des protéines Ara h 2 et isoforme d'Ara h 3, particulièrement immunoréactives. Ces études ont été menées à partir d'arachides ayant subi un traitement thermique, le grillage. En effet, l'arachide grillée est la forme la plus consommée dans les pays occidentaux. Cependant, l'arachide est consommée sous d'autres formes, frites ou bouillies. En Chine, où l'arachide est consommée sous forme bouillie, la fréquence de l'allergie à l'arachide serait plus faible. Il a été alors suggéré que le mode de consommation aurait une influence sur l'ampleur de l'allergie et, plus précisément, que l'ébullition de l'arachide diminuerait son potentiel allergénique. Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en étudiant l'influence de procédés thermiques tels que le grillage ou l'ébullition sur l'allergénicité de l'arachide et de certains de ses composants protéiques, Ara h 1 et Ara h 2.

Par ailleurs, nous avons vu que des dégradations naturelles et ménagées de protéines de l'arachide de la famille des albumines 2S et des globulines 11S ne supprimeraient pas leur immunoréactivité. La participation au programme Européen Allergest nous a permis de poursuivre cette analyse dans le cadre de procédés de dégradation plus complexes : l'effet de la digestion gastro-intestinale sur l'immunoréactivité de l'arachide a été étudié dans des modèles *in vitro* comme *in vivo*.

Une comparaison a été effectuée avec un allergène alimentaire d'origine animale, le lait de vache.

## **A. Effet des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide**

### **I. Introduction**

Les procédés technologiques de préparation des aliments, notamment les traitements thermiques, en altérant la structure d'une protéine, peuvent modifier le potentiel allergénique, laisser ce potentiel intact, ou bien faire apparaître de nouvelles structures immunoréactives. A travers cette introduction, nous allons présenter comment les procédés thermiques peuvent tout d'abord modifier la structure d'une protéine et ensuite son immunoréactivité.

#### **1. Procédés thermiques et structure des protéines**

Des altérations significatives dans la structure d'une protéine se produisent lors des procédés thermiques, la nature et l'étendu de tels changements dépendants de la température et la durée du procédé thermique mais également des caractéristiques intrinsèques de la protéine et des conditions physico-chimiques de l'environnement (pH par exemple).

Il est évident qu'il n'y a pas qu'un seul facteur impliqué dans la stabilité protéique, plusieurs pouvant contribuer à la résistance des protéines à la dénaturation par les procédés alimentaires, notamment la structure tridimensionnelle compacte, la liaison à des ligands et la glycosylation.

- La conformation tridimensionnelle

La conformation tridimensionnelle d'une protéine est déterminée par le repliement des chaînes polypeptidiques, repliement régi par des critères thermodynamiques et cinétiques. Même si aucun motif structural simple n'est associé avec la stabilité, les protéines des organismes thermophiles (capables de croître à des températures élevées) ont une meilleure propension à adopter des structures en feuillets. Il y aurait donc sûrement plus d'éléments de structures thermostables dans les feuillets que dans les hélices.

- Les ponts disulfures

Les approches d'ingénierie des protéines pour l'amélioration de la thermostabilité des protéines indiquent qu'il est difficile d'établir, même s'il existe, un lien simple et direct entre la stabilité et le nombre croissant de ponts disulfures. Il est généralement admis que les ponts disulfures peuvent contribuer à la stabilité de la forme native et dénaturée d'une protéine.

- La taille

La comparaison des protéines des organismes thermophiles et mésophiles ont montré que les protéines solubles sont en moyenne plus petites chez les thermophiles ce qui laisse suggérer un lien entre la taille et la stabilité thermique d'une protéine.

- Les glycosylations et glycations

En général, les amino-glycosylations ont un effet stabilisant significatif sur la structure d'une protéine. Ainsi, les glycosylations des globulines 7S du pois augmentent la stabilité du trimère et sa résistance à la dénaturation chimique. Les procédés alimentaires conduisent à des modifications covalentes des protéines, avec notamment la formation de composés de Maillard qui peuvent augmenter ou au contraire réduire la stabilité de la protéine. Dans les réactions de Maillard, les sucres modifient les groupes aminés sur les protéines pour former des composés d'Amadori, qui peuvent ensuite se réarranger pour produire une gamme d'adduits, connus comme des produits terminaux avancés de glycation (AGE). Les AGE se forment aussi bien pendant les traitements thermiques, et particulièrement lors des procédures de chauffage à sec telles que le grillage, ou lentement au cours du temps lors du processus de vieillissement des aliments et des systèmes biologiques.

## **2. Procédés thermiques et immunoréactivité des protéines**

### ***a) Généralités***

Il n'y a pas de règles générales quant à l'effet des changements structuraux induits par des procédés thermiques sur l'allergénicité. Certains allergènes, ou certains aliments allergéniques tels que le lait, les œufs, le poisson, les arachides et dérivés, sont décrits comme stables à la chaleur. D'autres sont considérés comme partiellement stables (le soja, les céréales, le céleri,

les noisettes et dérivés, par exemple) ou labiles (les fruits de la famille des *Rosaceae* et les carottes, par exemple) (Besler et *al.*, 2001). Les procédés thermiques peuvent également l'augmenter en créant de nouveaux épitopes allergéniques. Par exemple, la réaction de Maillard contribue à la formation de nouvelles structures immunologiquement réactives (néo-allergènes) (Davis et Williams, 1998). Les causes et les phénomènes, impliqués lors des procédés thermiques et responsables de l'altération significative de l'allergénicité d'un aliment, demeurent un problème complexe et non résolu à ce jour.

L'allergénicité d'une protéine n'est donc pas systématiquement associée à l'intégrité de sa structure native.

Il est donc difficile d'anticiper et de généraliser les effets de modifications dues aux traitements thermiques sur l'allergénicité des aliments. Ceci est également le cas pour les procédés biotechnologiques utilisés dans l'industrie alimentaire pour la production, le stockage et le « processing » (Poms et Anklam, 2004). De plus, au sein d'un même aliment, l'impact de ces traitements peut différer complètement d'un constituant allergénique à un autre. Par conséquent, en fonction du constituant allergénique de l'aliment responsable de la sensibilisation du patient, le procédé thermique peut être cliniquement important pour certains patients allergiques mais pas pour d'autres.

### **b) Le cas de l'arachide**

L'influence des traitements thermiques sur l'allergénicité de l'arachide est particulièrement importante car ils interviennent lors des procédés industriels comme lors des méthodes de cuissons traditionnelles.

Toutefois, les études publiées montrent des résultats parfois divergents. Selon les travaux de Maleki et *al.* (2000), un traitement à très haute température augmente la capacité de liaison aux IgE. A l'inverse, Burks et *al.* (1992) n'observent aucune modification de la capacité de liaison aux IgE et aux IgG spécifiques lorsque l'arachide est soumise à différents traitements thermiques, notamment le grillage. Les procédés thermiques à des températures plus basses comme lors de l'ébullition (100°C) ou lors de la friture (120°C), où les changements conformationnels induits par la chaleur se produisent mais où la réaction de Maillard n'a vraisemblablement pas lieu, n'affectent pas les propriétés allergéniques d'Ara h 1 (Beyer et *al.*, 2001).

Des modifications structurales ou des altérations fonctionnelles pour deux allergènes majeurs de l'arachide, Ara h 1 et Ara h 2, sont également décrites (Maleki et *al.*, 2000) (Maleki et *al.*, 2003).

Ainsi, la prévalence de l'allergie à l'arachide dépend des habitudes alimentaires et du type de cuisson traditionnellement utilisée par les populations diverses de pays différents : l'allergie à l'arachide est rare en Chine où les arachides sont consommées bouillies ou frites, tandis qu'elle est fréquente et plus sévère dans les pays occidentaux où elles sont consommées grillées (Beyer et *al.*, 2001).

### **3. Conclusion**

Aux vues des études que nous avons décrites dans cette introduction, nous avons donc décidé d'étudier le comportement de l'arachide et de ses allergènes lors des traitements thermiques de l'aliment entier, particulièrement lors du grillage et de l'ébullition. Le grillage constitue la forme la plus courante de consommation des arachides aux Etats-Unis et en Europe, pays où la prévalence de l'allergie à l'arachide est très élevée. En Chine, la méthode de cuisson la plus fréquente pour les arachides est l'ébullition. Or, dans ces pays, la prévalence de l'allergie à l'arachide est faible.

## **II. Matériels et méthodes**

### **1. Sérums**

L'étude de l'effet des procédés thermiques constitue les premiers travaux réalisés lors de la thèse. Elle a fait appel à une population de sérums différente de celle intervenant dans les deux chapitres précédents. Elle est composée de 35 sérums de patients suivis à l'hôpital Necker de Paris et de 2 patients provenant du département de pédiatrie de l'université de Vienne (Autriche). Les patients sont des enfants (22 garçons et 15 filles) de 2,5 à 17 ans (valeur de la médiane : 6 ans). Dans tous les cas, l'allergie à l'arachide est confirmée par des tests cliniques (tests cutanés, tests de provocation orale). Les manifestations cliniques présentées sont variées, de légères à sévères, avec des symptômes cutanés, gastro-intestinaux, respiratoires, voire généralisés.

### **2. Préparation des extraits protéiques de l'arachide pour l'étude de l'effet des procédés technologiques sur l'immunoréactivité**

Les arachides crues et grillées nous ont été fournies par un partenaire du programme européen Allergest, le Pr. Shmuel Yannai (Technion-Israel Institute of Technology-Department of Food Engineering and Biotechnology, Israël). Les arachides sont de variété virginienne, appelée Shosh (provenance Israël). Du beurre d'arachide a été également préparé par ce même partenaire.

Les arachides crues fournies ont été bouillies au laboratoire dans de l'eau courante à 100°C pendant 30 minutes. L'eau de cuisson a également été conservée pour des analyses ultérieures.

L'extraction protéique pour chaque type d'arachide et la purification des allergènes Ara h 1 et Ara h 2 ont été menées suivant le protocole décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit.

### **3. Analyse de la composition et étude de l'immunoréactivité des extraits d'arachides après les différents procédés thermiques**

La composition protéique des différents extraits est analysée par électrophorèse SDS PAGE et des immuno-empreintes, permettant d'identifier les protéines immunoréactives, sont réalisées selon le protocole décrit dans le premier chapitre.

Les méthodes d'analyses de l'immunoréactivité (test direct, test par compétition, test par compétition avec capture des IgE) ont été décrites dans le premier chapitre des pages 78 à 85.

### III. Résultats

#### 1. Effet des procédés thermiques sur la composition protéique de l'arachide

##### *a) Profils électrophorétiques et immuno-empreintes des fractions protéiques extraites d'arachides crues, grillées, bouillies et de l'eau de cuisson*

La composition protéique des extraits d'arachides crues, grillées et bouillies et de l'eau de cuisson est comparée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (figure 47a). Tous les échantillons analysés sont déposés à la même concentration protéique déterminée par la méthode BCA.

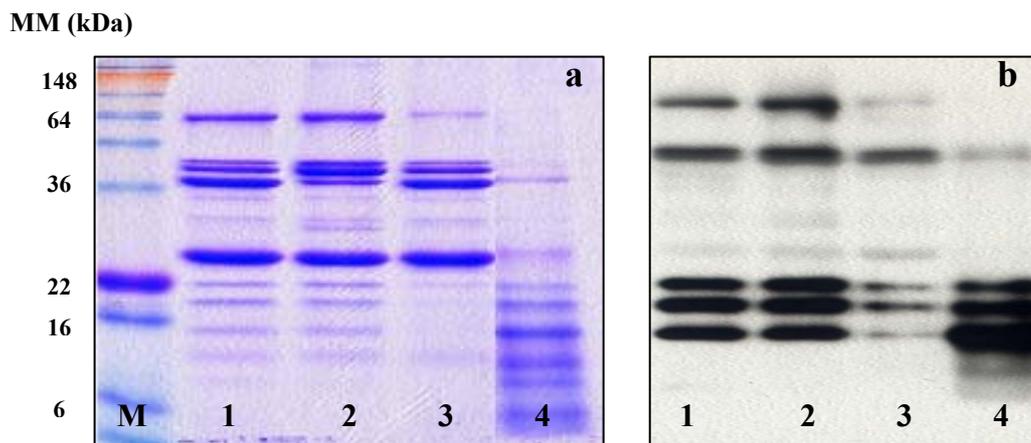


Figure 47 : (a) Profil électrophorétique des différents extraits d'arachides. (b) Immuno-empreinte réalisée sur les extraits d'arachides avec un sérum représentatif de notre population (#388). (1) extrait d'arachides crues, (2) extrait d'arachides grillées, (3) extrait d'arachides bouillies, (4) eau de cuisson. Les marqueurs de masse moléculaire sont déposés dans le puits indiqué par M.

Les masses moléculaires des entités séparées, estimées en SDS PAGE par comparaison avec les marqueurs standard de masse moléculaire, varient de 14 à 90 kDa (figure 47a). Des profils électrophorétiques similaires sont observés pour les extraits d'arachide cru et grillé : une bande de masse moléculaire de 65 kDa correspondant à Ara h 1, quatre bandes relativement intenses de 25 à 45 kDa, correspondant probablement à des fragments de globulines 11S et deux bandes à 18 et 20 kDa correspondant aux deux isoformes caractéristiques d'Ara h 2. La

bande à 14 kDa représente Ara h 6. Par contre, le profil électrophorétique de l'extrait d'arachide bouillie (dépôt 3) se distingue de celui des arachides crues et grillées par une atténuation des bandes protéiques d'Ara h 1 et celles de faible masse moléculaire (comprise entre 14 et 20 kDa), notamment Ara h 2 et Ara h 6 (dépôt 3). Parallèlement, l'analyse de l'eau de cuisson (dépôt 4) permet de mettre en évidence des entités protéiques essentiellement dans cette même gamme de masse moléculaire laissant donc suggérer une fuite des protéines correspondantes dans l'eau de cuisson.

Les immuno-empreintes réalisées avec les différents extraits d'arachides sont représentées en figure 47b. Elles font apparaître les allergènes décrits de l'arachide, notamment Ara h 1 (de masse moléculaire proche de 65 kDa), les fragments de globulines 11S (de masse moléculaire comprise entre 25 et 45 kDa), Ara h 2 (deux isoformes à 16 et 18 kDa) et les protéines de faible masse moléculaire comprise entre 10 et 16 kDa, correspondant probablement à Ara h 6 et aux autres fragments des albumines 2S. Comme sur les électrophorèses, la principale différence concerne les profils de reconnaissance des allergènes de faible masse moléculaire dans les différents extraits et particulièrement dans l'extrait d'arachides bouillies où une intensité de liaison plus faible des IgE aux allergènes de masse moléculaire, comprise entre 14 et 20 kDa est observée. Toutefois, une partie de ces allergènes se retrouve dans l'eau de cuisson.

***b) Profils électrophorétiques et immuno-empreintes obtenus avec les extraits d'arachides crues, grillées, bouillies et avec l'eau de cuisson***

L'analyse des allergènes Ara h 1 et Ara h 2 extraits et purifiés à partir des arachides crues, grillées et bouillies est présentée en figure 48a.

Pour chacun des deux allergènes, les masses moléculaires, déterminées par spectrométrie de masse MALDI TOF, et la séquence des acides aminés amino-terminaux sont conservées après grillage ou ébullition de l'extrait cru (non montré). L'image électrophorétique d'Ara h 1 (dépôts 1 à 3) permet d'observer la même bande proche de 65 kDa quelque soit l'extrait. Cependant, une bande de haute masse moléculaire (supérieure à 148 kDa) peut être observée pour Ara h 1 purifié à partir d'arachide grillée. Cette bande correspond à la forme trimérique d'Ara h 1 décrite par Maleki et *al.* (2000) et Beyer et *al.* (2001). Ara h 2 (dépôts 4 à 6) est toujours retrouvé sous la forme caractéristique de deux bandes de 16 et 18 kDa.

Les allergènes Ara h 1 et Ara h 2, purifiés à partir des extraits d'arachides crues, grillées et bouillies, sont reconnus par les IgE spécifiques selon la même intensité (figure 48b). La forme trimérique d'Ara h 1, présente dans l'Ara h 1 grillé et représentée par une bande de masse moléculaire plus élevée, est également bien reconnue par les IgE spécifiques.

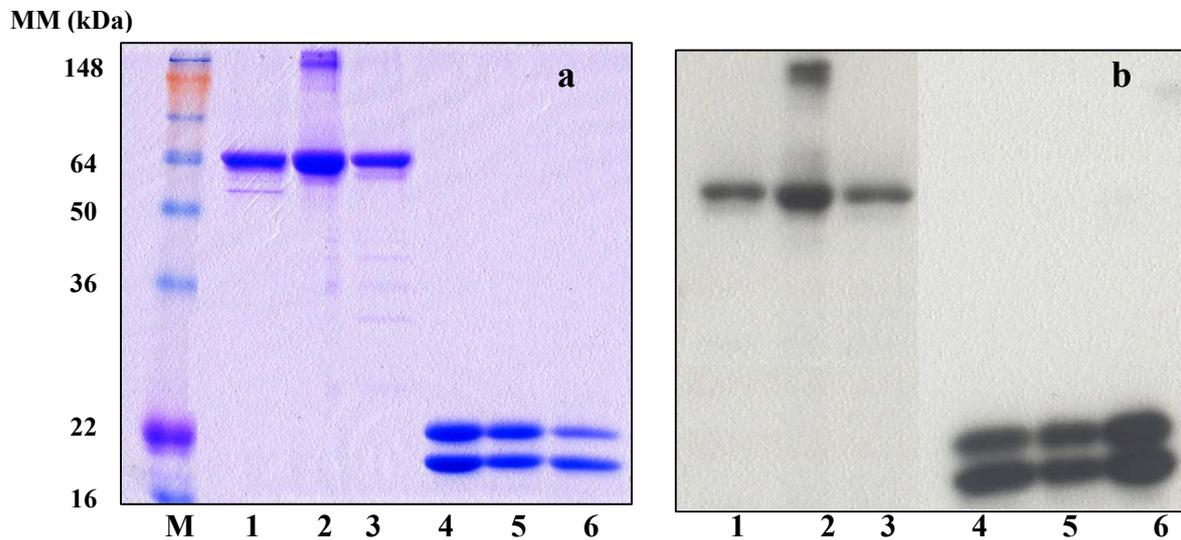


Figure 48 : (a) Profil électrophorétique des différentes protéines purifiées. (b) Immuno-empreinte réalisée sur les différentes protéines purifiées avec un sérum représentatif de notre population (388). Ara h 1 purifié à partir d'arachide (1) crue (2) grillée, (3) bouillie, Ara h 2 purifié à partir d'arachide (4) crue, (5) grillée, (6) bouillie. Les marqueurs de masse moléculaire sont indiqués par « M ».

## 2. Détermination de la réponse IgE spécifique contre les extraits d'arachides crues, grillées et bouillies par des tests immuno-enzymatiques

### *a) Analyse de la réponse IgE aux extraits d'arachide brute par test direct*

La caractérisation de la réponse IgE spécifique et sa quantification ont été effectuées à l'aide du test immuno-enzymatique direct sur les 37 sérums de patients allergiques à l'arachide. Les concentrations d'IgE spécifiques sont rapportées pour chaque sérum et pour chaque type d'extrait sur la figure 49.

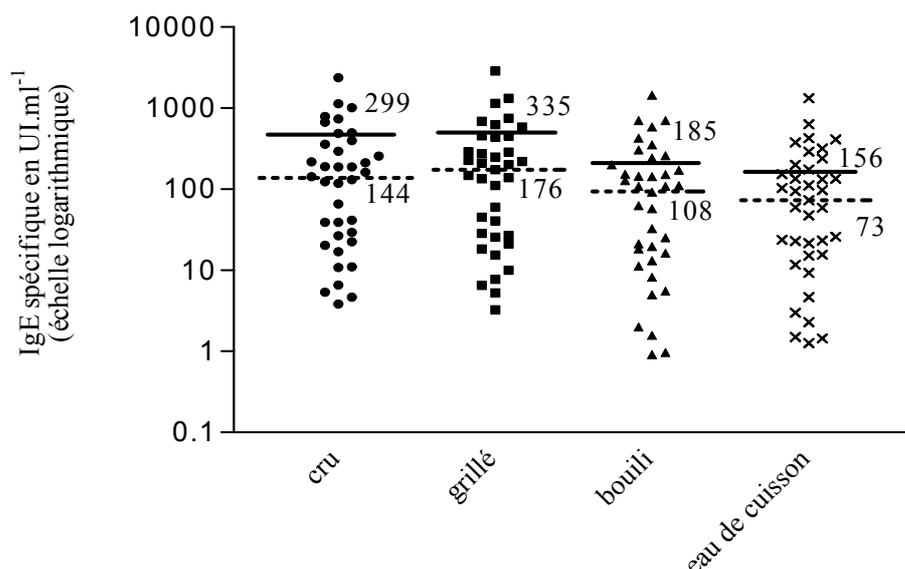


Figure 49 : Analyse de la réponse IgE contre les différents extraits protéiques d'arachide. Les différents points représentent la concentration en IgE spécifiques exprimée en UI.ml<sup>-1</sup> pour chacun des 37 sérums testés.

\_\_\_\_\_ : valeur moyenne pour les 37 sérums

----- : valeur médiane pour les 37 sérums

Les extraits protéiques issus d'arachides crues, grillées et bouillies, ainsi que la fraction protéique retrouvée dans l'eau de cuisson, sont tous reconnus par chacun des sérums analysés. Cependant, les valeurs rapportées sur la figure 49 montrent une très grande dispersion et une importante variabilité inter-individus dans les concentrations en IgE anti-arachide quelque soit le traitement thermique appliqué. Elles peuvent varier d'un facteur 1000 dans une population de patients allergiques de même origine. Pour l'ensemble de la population de patients allergiques cependant, la répartition des réponses IgE spécifiques des extraits est semblable.

Tableau 24 : Résultats des tests statistiques (test de Friedmann et corrélation des rangs de Spearman) de comparaison des différents extraits bruts d'arachide deux à deux.

r est le coefficient de corrélation et P est la probabilité d'avoir un effet significatif (\* : P<5%, test significatif ; \*\* : P<1%, test très significatif ; \*\*\* : P<10<sup>-3</sup>, test hautement significatif ; ns : non significatif).

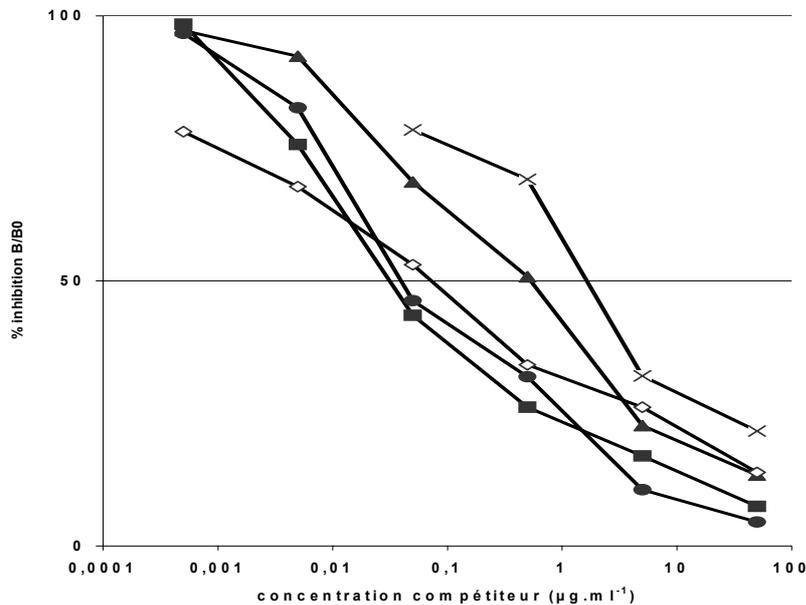
		grillé/cru	grillé/bouilli	cru/bouilli	grillé/eau	cru/eau	bouilli/eau
test de Friedmann	P	ns	***	***	***	***	*
corrélation Spearman	r	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99
	P	***	***	***	***	***	***

Le calcul des valeurs moyennes et médianes ne fait apparaître aucune différence statistiquement significative entre les réponses IgE aux deux extraits grillé et cru (tableau 24). Par contre, l'extrait protéique issu d'arachides bouillies engendre une reconnaissance par les IgE inférieure de 50% à celles obtenues avec les extraits de graines grillées ou crues. Cette différence est confirmée statistiquement par le test de Friedman ( $P < 0,001$ ) (tableau 24). Une part importante des IgE des patients fixe également les protéines extraites de l'eau de cuisson. La distribution en est très voisine de celle des IgE anti-protéines d'arachides bouillies (figure 47) bien que les valeurs moyennes et médianes soient statistiquement inférieures (respectivement 138 vs 164 et 53 vs 60 UI.ml<sup>-1</sup>) ( $P < 0,05$ ) (tableau 24). De façon surprenante, la somme des réponses IgE médianes contre l'extrait bouilli et contre les protéines présentes dans l'eau de cuisson ( $\Sigma = 113$  UI.ml<sup>-1</sup>) correspond aux réponses IgE médianes contre les extraits cru (121 UI.ml<sup>-1</sup>) et grillé (137 UI.ml<sup>-1</sup>).

Le calcul des corrélations des rangs de Spearman, test statistique s'appliquant à des populations de répartition non gaussienne, montrent une forte corrélation quelque soit le couple étudié. Elle est toujours supérieure à 0,97 et hautement significative (tableau 24). Ce résultat traduit que toutes les réponses IgE spécifiques des patients allergiques évoluent d'une manière homogène à la suite du traitement subi par les arachides. Nous n'observons donc aucune différence de spécificité entre les différents extraits puisque ces derniers ont été testés avec les mêmes populations d'IgE.

***b) Analyse de la réponse IgE des extraits d'arachides crues, grillées, bouillies et de l'eau de cuisson par test indirect***

L'immunoréactivité des différents extraits bruts d'arachides a été également analysée à l'aide d'un test immuno-enzymatique par compétition. Les compétiteurs utilisés consistent en des concentrations croissantes d'extraits protéiques d'arachides crues, grillées ou issus de l'eau de cuisson. Un dernier compétiteur obtenu après ébullition d'un extrait protéique d'arachides crues est intervenu lors de ces tests. Les profils d'inhibition observés en figure 50 (pour le sérum 393) sont représentatifs des tendances obtenues pour les différents sérums testés.

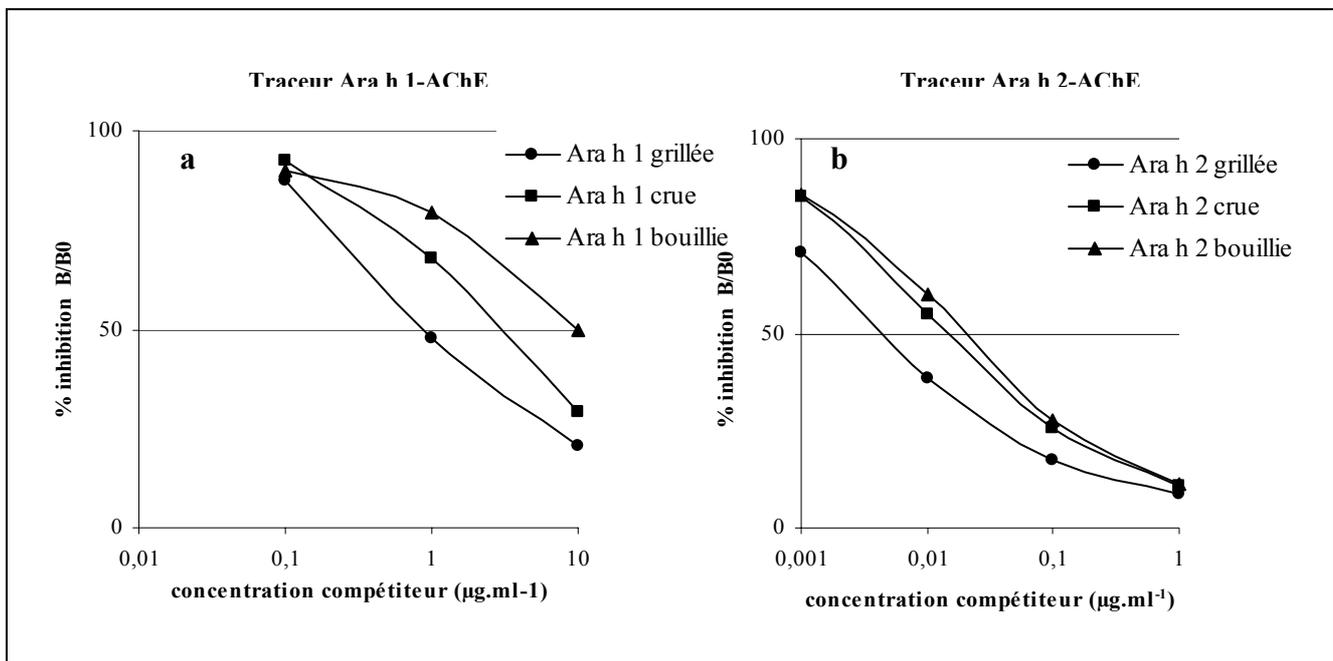


**Figure 50 : Courbes d'inhibition de la liaison IgE spécifiques à l'extrait d'arachides crues immobilisées par des concentrations croissantes d'extraits obtenues pour un sérum (393). Extrait ■ : arachides crues ; ● : arachides grillées ; ▲ : arachides bouillies ; X : eau de cuisson ; ◇ : arachides crues puis extrait protéique bouilli.**

La liaison des IgE spécifiques à l'extrait d'arachides crues immobilisés est partiellement ou complètement inhibée par les différents compétiteurs. Les courbes d'inhibition obtenues avec les extraits d'arachides crues et grillées sont similaires démontrant une immunoréactivité très proche de ces extraits. De même, l'ébullition d'un extrait protéique issu d'arachide crue ne diminue pas ses capacités d'inhibition. Par contre, l'extrait protéique issu d'arachides bouillies déplace plus difficilement la liaison. L'inhibition de 50% des liaisons nécessite au moins 10 fois plus d'extrait bouilli que d'extraits crus et grillés. Les mêmes différences d'inhibition sont observées entre l'extrait protéique issu d'arachides bouillies et l'échantillon obtenu après ébullition de l'extrait issu d'arachides crues. Les résultats présentés en figure 50 ont été obtenus avec l'extrait d'arachides crues immobilisé. Nous obtenons les mêmes résultats lorsque les plaques sont sensibilisées avec un extrait d'arachides grillées.

**c) Analyse de l'immunoréactivité des allergènes Ara h 1 et Ara h 2 purifiés à partir des différents extraits**

L'immunoréactivité des allergènes Ara h 1 et Ara h 2, purifiés à partir d'arachides crues, grillées et bouillies a été analysée par des tests immuno-enzymatique par compétition avec capture des IgE. La liaison du traceur Ara h 1-AChE ou Ara h 2-AChE aux IgE de patients allergiques à l'arachide capturées sur la phase solide est inhibée par des concentrations croissantes d'Ara h 1 ou d'Ara h 2. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> d'Ara h 1 ou d'Ara h 2 issues d'arachides crues, grillées, bouillies ont été évaluées pour cinq patients représentatifs de notre population d'étude (386, 388, 392, 393, 458). La figure 51 est obtenue avec le sérum 393.



**Figure 51 : (a) courbes d'inhibition de la liaison des IgE capturées au traceur Ara h 1 par des concentrations croissantes d'Ara h 1 purifié des différents extraits, obtenues avec le sérum 393. (b) courbes d'inhibition de la liaison des IgE capturées au traceur Ara h 2 par des concentrations croissantes d'Ara h 2 purifié des différents extraits, obtenues avec le sérum 393. Allergène purifié de l'arachide (●) grillée (■) crue (▲) bouillie.**

La liaison d'Ara h 1-AChE aux IgE est inhibée par tous les extraits d'Ara h 1 purifiés (cru, grillé, bouilli). Avec les cinq patients étudiés, l'inhibition la plus importante est obtenue avec l'allergène Ara h 1 grillé, comme cela est représenté en figure 51a pour le sérum 393. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues avec Ara h 1 grillé sont comprises entre 0,3 et 1,5 µg.ml<sup>-1</sup> (i.e. 5-25 pmol.ml<sup>-1</sup>). Elles sont 2 à 20 fois inférieures à celles obtenues avec Ara h 1 cru et Ara h 1 bouilli. Pour 4 sérums sur les cinq testés, les déplacements estimés sont plus forts avec Ara h

l cru qu'avec Ara h 1 bouilli. Toutefois, les comparaisons d'IC50 ne démontrent pas des différences supérieures à 33% entre Ara h 1 cru et Ara h 1 bouilli.

Pour tous les patients, la liaison d'Ara h 2-AChE aux IgE capturées est complètement inhibée par l'allergène Ara h 2 extrait d'arachides crues, grillées ou bouillies. Les inhibitions les plus fortes sont observées pour Ara h 2 grillé (figure 51b). Les valeurs d'IC50 obtenues avec Ara h 2 grillé, cru et bouilli sont comprises respectivement de 2 à 6 ng.ml<sup>-1</sup> (i.e. 0,1-0,3 pmol.ml<sup>-1</sup>), 4 à 15 ng.ml<sup>-1</sup> (i.e. 0,2-0,8 pmol.ml<sup>-1</sup>) et 4 à 20 ng.ml<sup>-1</sup> (i.e. 0,2-1 pmol.ml<sup>-1</sup>). Contrairement à ce qui a été observé pour Ara h 1, les valeurs d'IC50 mesurées pour Ara h 2 extrait d'arachides crues et bouillies sont similaires.

Les valeurs d'IC50 sont au moins 100 fois plus faible pour Ara h 2 que pour Ara h 1 ce qui suggère que les IgE de patients allergiques ont une affinité apparente plus importante pour Ara h 2 que pour Ara h 1. La différence est atténuée si la concentration en inhibiteur est exprimée en molarité et non pas en concentration. Mais, cette comparaison entre les valeurs d'IC50 est compliquée à interpréter puisque la préparation des traceurs, et particulièrement celle d'Ara h 1-AChE, n'est pas complètement contrôlée en terme de concentration de dérivés intermédiaires activés et finalement en terme de ratio enzyme/allergène, ce qui peut influencer l'affinité apparente des IgE spécifiques pour Ara h 1 et Ara h 1-AChE.

## IV. Discussion

Des modifications significatives de la structure protéique se produisent pendant les procédés thermiques. Ces effets dépendent de la nature et de la durée du procédé appliqué. Avec l'augmentation de la température, il est admis que la perte de la structure tertiaire est suivie d'un dépliement réversible, puis d'une perte de structure secondaire (70-80°C), de la formation de nouvelles interactions intra-/inter-moléculaires, de réarrangements de ponts disulfures (80-92°C) et finalement la formation d'agrégats (90-100°C) (Davis et Williams, 1998). Les traitements thermiques peuvent donc dégrader des épitopes conformationnels par la dénaturation des protéines, c'est-à-dire par la modification de la structure des protéines et au contraire, exposer des épitopes linéaires pour la liaison avec les IgE spécifiques (Davis et Williams, 1998). La dénaturation thermique peut expliquer la perte de 90% de l'immunoréactivité des allergènes de la noisette Cor a 1.04 et Cor a 2, allergènes labiles à la

chaleur (Hansen et *al.*, 2003). Ce phénomène n'est pas systématiquement observé et dépend des caractéristiques intrinsèques de la protéine. Ainsi, l'allergénicité de petites protéines, particulièrement les LTP, n'est pas affectée par un traitement thermique à 100°C pendant 90 minutes du maïs (Pastorello et *al.*, 2003) et de la noisette (Hansen et *al.*, 2003). A l'inverse, Maleki et *al.* (2000) ont montré que la capacité de liaison aux IgE des arachides grillées était approximativement 90 fois plus importante que celle des arachides crues. La technique de grillage des arachides consiste généralement en une élévation de température jusqu'à 140°C, pendant 40 minutes. A des températures aussi élevées, des modifications chimiques surviennent et peuvent créer des liaisons covalentes entre les résidus lysine de la protéine et d'autres constituants de la matrice alimentaire conduisant à la formation d'adduits variés (Chung et *al.*, 2003). Ils contribuent à la formation de nouvelles structures immunologiquement réactives.

Avec notre population d'étude, malgré une variabilité de la réponse IgE contre les extraits d'arachides, nous avons préservé les mêmes effets des traitements thermiques sur la capacité de liaison aux IgE des extraits bruts d'arachide chez tous les patients : les liaisons des IgE aux extraits d'arachides crues et grillées ne sont pas significativement différentes tandis que celles de l'extrait d'arachides bouillies et de l'eau d'ébullition sont approximativement 1,5 à 2 fois plus faibles. Ces résultats sont confirmés par nos tests ELISA par compétition.

Lors de cette étude, les différences d'immunoréactivité entre les arachides grillées et crues sont beaucoup plus faibles que celles précédemment décrites dans la littérature (facteur d'environ 2 à 5 seulement contre 90 dans l'étude de Maleki et *al.* (2000). Nos tests par compétition effectués avec les extraits protéiques bruts montrent que les extraits issus d'arachides crues et d'arachides grillées possèdent une immunoréactivité semblable.

A l'inverse, notre étude des allergènes purifiés Ara h 1 et Ara h 2 montre que ces allergènes issus d'arachides grillées ont une meilleure capacité d'inhibition que ceux purifiés à partir des extraits crus. En effet, il a été précédemment démontré qu'Ara h 2 possède des motifs cystéines similaires aux LTP et, par conséquent, un repliement semblable aux LTP (Sellers et *al.*, 2000) qui leur confère la propriété de stabilité à la chaleur (Schocker et *al.*, 2000). Des modifications structurelles d'Ara h 2 ont également été observées après le grillage par Maleki et *al.* (2000), Maleki et *al.* (2003) et Maleki et *al.* (2004) et peuvent également résulter en une augmentation de la capacité de liaison aux IgE. Très récemment, Gruber et *al.* (2005) ont également décrit l'influence des réactions de Maillard sur l'allergénicité d'Ara h 2 recombinant et de ses épitopes majeurs. L'Ara h 2 ainsi modifié après addition de

carbohydrates présente une capacité de liaison aux IgE significativement augmentée. Ces effets sont observés autant avec les sérums de patients qu'avec le sérum de lapin anti-Ara h 2 recombinant, ce qui souligne que cette augmentation d'immunoréactivité, notamment la capacité de liaison aux IgE, n'est pas uniquement liée à la sensibilisation à des néo-allergènes mais qu'elle est accentuée par la formation de produits de Maillard (Gruber *et al.*, 2005).

Dans notre étude, l'existence de sucre après grillage n'est pas observée puisqu'Ara h 2 grillé présente une masse moléculaire identique à celle d'Ara h 2 cru, cette masse étant conforme à celle estimée à partir des séquences d'acides aminés non modifiés (hydroxyprolines exceptées). Les différences observées dans la réponse IgE entre Ara h 2 grillé et Ara h 2 cru sont plus vraisemblablement dues à des modifications de la structure tridimensionnelle démasquant des épitopes. Ce phénomène a été suggéré lors de l'étude de Gruber *et al.* (2005) décrivant une augmentation significative de la capacité de liaison des IgE à la suite d'un traitement thermique seul sans adjonction de carbohydrates.

L'interaction d'Ara h 2 avec Ara h 1 pendant le grillage peut expliquer en partie l'augmentation de l'immunoréactivité d'Ara h 1 extrait d'arachides grillées que nous avons observée. En effet, Ara h 2 protège Ara h 1 de la dégradation par la trypsine, et cette caractéristique de protection est augmentée par le grillage (Maleki *et al.*, 2003). Il a été également montré qu'après le grillage, Ara h 1 conduit à la formation de trimères très stables par des liaisons intermoléculaires (Maleki *et al.*, 2000). Les produits de réactions de Maillard peuvent contribuer également à l'augmentation de la capacité de liaison des IgE aux protéines d'arachides grillées (Maleki *et al.*, 2000). Mais, l'augmentation de l'immunoréactivité d'Ara h 1 observée après traitement thermique est beaucoup plus importante que celle observée dans nos travaux. Ces discordances peuvent être notamment dues aux différences dans les populations d'étude : différence d'âge, de caractéristique génétique, d'habitudes alimentaires et de modes de consommation de l'arachide.

Les différences d'immunoréactivité observées pour les allergènes Ara h 1 et Ara h 2 purifiés à partir d'extraits crus et grillés ne sont pas conservées lors de la comparaison de l'immunoréactivité des extraits protéiques bruts. Ce phénomène démontre que l'immunoréactivité d'Ara h 1 associée à celle d'Ara h 2 ne résumant pas celle de l'aliment entier. La matrice protéique de l'arachide est complexe et d'autres allergènes tels qu'Ara h 6, les globulines 11S peuvent intervenir et donc compenser ou atténuer ou amplifier les effets observés sur Ara h 1 et Ara h 2. L'allergénicité de l'aliment entier dépend de la contribution de plusieurs allergènes qui réagissent différemment au « processing » et au traitement

thermique. La nature, l'intensité, la durée et les conditions des procédés thermiques peuvent avoir un impact différent sur la structure des différentes protéines allergéniques, sur leur interaction avec d'autres constituants de la matrice alimentaire, et sur leur allergénicité. Des structures allergéniques peuvent être détruites tandis que d'autres, particulièrement les fragments peptidiques de faible masse moléculaire, peuvent être formés. Toutes ces interactions peuvent expliquer les différences observées sur les effets des procédés thermiques pour les extraits alimentaires bruts en comparaison aux allergènes purifiés.

Le grillage modifie peu l'immunoréactivité globale de l'arachide mais son ébullition entraîne une forte diminution de la reconnaissance par les IgE. Dans le cas d'un chauffage par voie humide, la diminution de l'allergénicité de l'extrait d'arachides bouillies s'explique notamment en grande partie par la perte de protéines allergéniques qui passent de la graine dans l'eau de cuisson. Ceci est démontré par l'électrophorèse de la figure 47a où les extraits protéiques, correspondant à Ara h 1 et à des protéines de faible masse moléculaire (Ara h 2 et Ara h 6), disparaissent du profil électrophorétique de l'arachide bouillie versus crue. A l'inverse, nous pouvons noter l'apparition de nombreuses entités de faible masse moléculaire dans l'eau de cuisson (figure 47). Ces entités sont fortement immunoréactives comme démontré par l'immuno-empreinte de la figure 47b. L'événement majeur se produisant pendant l'ébullition est donc la solubilisation ce qui explique la présence de fragments peptidiques de faible masse moléculaire dans l'eau de cuisson. Ces hypothèses établies pour les allergènes de faible masse moléculaire, Ara h 2 et Ara h 6, ne semblent pas applicables à Ara h 1 dont la présence dans l'eau de cuisson est apparemment faible. Pourtant, la disparition d'Ara h 1 dans l'extrait d'arachides bouillies est observée dans notre profil électrophorétique. Et la diminution de l'allergénicité de l'arachide bouillie a été corrélée avec une diminution de la concentration estimée en Ara h 1 (Beyer et *al.*, 2001). En effet, les auteurs ont observé un taux réduit d'Ara h 1 dans les arachides bouillies (100°C) et frites (120°C) en comparaison aux arachides crues, ce qui peut être dû à une dégradation possible dans le premier cas et à une agrégation possible de la protéine dans le dernier cas. Une telle agrégation pourrait se produire dans notre expérience mais l'électrophorèse sous des conditions dénaturantes et réductrices ne serait pas appropriée pour mettre clairement en évidence cet événement. Toutefois, les profils électrophorétiques obtenus à partir de l'extrait d'arachides crues et de ce même extrait bouilli 30 minutes (résultat non montré) ne présentent aucune différence significative en terme de composition protéique. De plus, nous observons une diminution de l'immunoréactivité d'Ara h 1 purifié à partir d'arachides bouillies. Il est envisageable que le

traitement thermique seul, survenant au cours de l'ébullition, puisse modifier l'immunoréactivité de l'allergène Ara h 1.

Ainsi, il apparaît que la diminution globale de l'immunoréactivité observée pour les arachides bouillies n'est pas due à des seules modifications structurelles des protéines mais principalement à une fuite d'allergènes vers l'eau de cuisson, notamment par solubilisation des protéines ou fragments peptidiques de faible masse moléculaire. Ce phénomène semble corrélé avec la faible prévalence de l'allergie à l'arachide dans les pays où les arachides sont cuites de cette façon (ébullition), tels que la Chine, l'Ile de la Réunion...

---

## **B. EFFET DE LA DIGESTION GASTRO-INTESTINALE SUR L'IMMUNOREACTIVITE DES ALIMENTS**

### **I. Introduction**

#### **1. L'exposition des allergènes à travers le tractus gastro-intestinal**

Il est généralement reconnu que l'hydrolyse d'une protéine réduit son allergénicité : ainsi les hydrolysats de protéines sont couramment utilisés dans des formules dites « hypo-allergéniques ». Cependant, il s'avère que des peptides de seulement 14 à 15 acides aminés peuvent déclencher une réaction allergique (Fritsche et *al.*, 2005). De plus, si la protéolyse peut détruire certains épitopes, notamment les épitopes conformationnels, elle peut également démasquer des épitopes linéaires, qui sont cachés dans la structure native tridimensionnelle et/ou dans les domaines hydrophobes de la protéine. Ils sont ainsi disponibles pour la liaison avec les IgE et la manifestation de leur allergénicité (Wal, 2002).

Pour qu'un allergène puisse sensibiliser un individu prédisposé à travers le tractus gastro-intestinal, il doit en théorie arriver aux sites de la réponse immunitaire c'est-à-dire au niveau intestinal. La majorité des allergènes végétaux appartiennent soit à la superfamille des prolamines (comprenant les prolamines de réserve des céréales, les LTP, les albumines 2S et les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase), soit à la superfamille des cupines (comprenant les globulines 11S ou légumine et les globulines 7S ou vicilines). L'abondance de ces protéines dans l'alimentation leur confère un avantage certain pour sensibiliser la muqueuse intestinale. Ces familles protéiques doivent présenter également des caractéristiques structurales et biologiques leur permettant de préserver leur structure des effets destructifs de l'organisme, et notamment la résistance au bas pH, à la protéolyse et aux surfactants tels que les sels biliaires. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la stabilité à des pH extrêmes tels que ceux rencontrés dans le tractus gastro-intestinal, notamment la structure tridimensionnelle compacte et la liaison à des ligands. Nous allons donc approfondir comment les activités biologiques et les structures tridimensionnelles des allergènes peuvent conférer une stabilité au dépliement et une résistance à la protéolyse.

## 2. La structure des protéines et leur résistance à la protéolyse

- Les sites de clivage

Pour qu'une protéine soit hydrolysée par une protéase, cette dernière doit accéder à son site de clivage. Lors des protéolyses limitées des protéines, seuls quelques uns des sites de clivage protéolytique possibles sont réellement coupés. La protéolyse est favorisée dans les boucles exposées plutôt que dans les hélices ou les feuillets, et la prédiction des sites de clivage des structures pourra être réalisée avec une bonne confiance par modélisation moléculaire. La sensibilité des protéines aux dégradations enzymatiques dépend également des modifications apportées à leurs structures. La glycosylation protège les protéines de la protéolyse par formation d'un « bouclier » de carbohydrates sur les sites de clivage potentiel. Ainsi, en augmentant à la fois la stabilité de la conformation native d'une protéine et les encombrements stériques, la glycosylation est responsable de la résistance à la protéolyse observée pour certaines glycoprotéines. La glycation peut également protéger ou au contraire favoriser la digestion d'une protéine. En effet, la glycation implique la modification des acides aminés basiques, la lysine et l'arginine. Ainsi, la protéolyse par la trypsine pourra être réduite simplement par blocage des sites de clivage de la protéase. Les effets de la protéolyse par les enzymes montrant d'autres spécificités sont complexes, et peuvent être liés à la modification de la structure tridimensionnelle de la protéine. Le dépliement est nécessaire pour qu'une protéase puisse accéder aux sites de clivage putatifs, particulièrement pour les enzymes spécifiques des acides aminés les plus hydrophobes. En effet, de tels résidus sont généralement cachés à l'intérieur de la molécule. Ainsi, la dénaturation des protéines alimentaires par les méthodes de cuisson par exemple s'accompagnant de glycations et de modifications de Maillard pourra potentialiser la protéolyse. Cependant, ces phénomènes pourront aussi être compensés par les encombrements stériques qui résultent de la formation d'agrégats protéiques induits thermiquement, associée à la glycation des protéines.

- Les interactions avec les lipides

Les familles de protéines telles que les lipocalines à laquelle la  $\beta$ -lactoglobuline appartient, et les LTP possèdent un site de liaison aux lipides et montrent une stabilité augmentée lorsque ce site est occupé. Ainsi, la thermostabilité de la  $\beta$ -lactoglobuline augmente par liaison avec les lipides (Creamer, 1995).

Beaucoup d'allergènes végétaux sont également capables de s'associer par adsorption avec les structures lipidiques. Par exemple, les protéines appartenant aux superfamilles des prolamines et des cupines peuvent se lier aux lipides de membranes et/ou agir comme des émulsifiants du fait de l'adsorption à leurs surfaces de gouttelettes lipidiques. De telles propriétés ont été démontrées pour les LTP, les albumines 2S (Burnett et *al.*, 2002) et les globulines 7S et 11S de légumineuses comme le soja (Kinsella, 1979). Ces associations lipides-protéines peuvent se produire naturellement dans l'aliment, mais également suite aux procédés thermiques qui généralement potentialisent les propriétés émulsifiantes des protéines, ou dans le tractus gastro-intestinal suite aux processus digestifs. Les protéines associées avec les bi-couches lipidiques vont voir leur stabilité thermique augmentée tandis que les protéines associées aux lipides pourront être protégées de la dégradation intestinale. Outre l'effet protecteur de ces associations sur des modifications thermiques ou digestives, l'association d'allergènes alimentaires avec les lipides membranaires des cellules de la muqueuse intestinale ou par adsorption à des gouttelettes lipidiques formées dans le tractus gastro-intestinal pourra par ailleurs faciliter le passage de l'allergène à travers la paroi intestinale.

- Digestion et spécificité de séquence

La digestion gastrique et duodénale met en jeu des endopeptidases qui présentent généralement des spécificités de séquences. Après l'hydrolyse pepsique dans l'estomac, la digestion se poursuit ensuite dans le tractus digestif où les protéines alimentaires et les fragments peptidiques vont rencontrer plusieurs exopeptidases, dont des amino- et carboxypeptidases. Le taux de protéolyse dû aux exopeptidases dépend des hydrolyses initiales occasionnées par les endopeptidases.

### **3. La stabilité des protéines lors de la digestion : une caractéristique des allergènes alimentaires ?**

La stabilité lors de la digestion est utilisée comme un des critères « positifs » par l'évaluation de l'allergénicité d'une protéine. Cette méthode est attractive car elle ne nécessite pas l'utilisation d'animaux de laboratoire et requiert seulement des quantités modestes de la protéine à tester et des méthodes d'analyses biochimiques simples (électrophorèses par exemple). Ce critère découle des travaux de Astwood et *al.* (1996) démontrant que parmi 16 allergènes testés, tous se montrent plus résistants à la digestion pepsique *in vitro* que 9

protéines des plantes courantes qui interviennent dans l'alimentation et connues comme non allergènes: la stabilité des allergènes est établie entre 8 et 60 minutes et celle des non allergènes inférieure à 15 secondes. Plusieurs études ont confirmé ces résultats en démontrant clairement une relation entre la résistance de protéine d'origine végétale à la digestion dans un fluide gastrique simulé (SGF) et une activité allergique (Taylor et *al.*, 1987) (Burks et *al.*, 1992) (Taylor et *al.*, 1996) (Becker et *al.*, 1997) (Besler et *al.*, 2001). Cependant, la corrélation résistance à la dégradation digestive et allergénicité n'est pas systématiquement vérifiée. D'une part, la résistance des protéines aux dégradations enzymatiques n'induit pas forcément une sensibilisation allergique. Pour Kenna et Evans (2005), sur 24 protéines non allergéniques testées, 10 étaient stables et/ou formaient des fragments peptidiques stables après 60 minutes de digestion. D'autre part, les allergènes alimentaires ne sont pas nécessairement plus résistants à la digestion que les protéines non allergéniques. Vieths et *al.* (1999) ont mesuré la digestibilité des allergènes de l'arachide et de la noisette et ont trouvé que bien que les allergènes de l'arachide soient stables, les allergènes natifs de la noisette sont sensibles à la digestion. Ces divergences sont retrouvées pour différents allergènes d'un même aliment, par exemple le lait de vache. En effet, pour les allergènes du lait de vache : les caséines sont peu affectées par la chaleur mais sont très sensibles à la protéolyse tandis que la  $\beta$ -lactoglobuline perd sa conformation lors des traitements thermiques mais reste résistante à la digestion par les enzymes. Ces deux protéines sont néanmoins des allergènes majeurs du lait de vache. De même, Yagami et *al.* (2000) ont montré qu'un certain nombre d'allergènes alimentaires végétaux (avocat, kiwi, banane, pomme de terre, melon, pêche) étaient dégradés rapidement dans le SGF. Enfin, Fu et *al.* (2002) et Fu (2002) ont démontré que la stabilité digestive des allergènes alimentaires variaient de 0 à 120 minutes. Les allergènes alimentaires ne sont donc pas nécessairement plus résistants à la digestion que les protéines non allergéniques. Restreindre l'évaluation de l'allergénicité au seul critère de résistance à la digestion enzymatique n'apparaît pas justifié et la stabilité de très nombreux allergènes alimentaires dans des modèles *in vivo* reste à établir avant toute conclusion hâtive.

#### **4. Les études de la résistance des allergènes de l'arachide et du lait de vache au cours de la digestion gastro-intestinale**

A ce jour, aucune étude *in vivo* n'a été menée pour étudier le comportement des allergènes de l'arachide et du lait de vache dans le tractus gastro-intestinal. Seules des simulations de digestions ont été effectuées sur les allergènes du lait de vache et de l'arachide.

- La résistance à la digestion gastro-intestinale des allergènes du lait de vache

Plusieurs études, dont les résultats sont parfois divergents, ont porté sur la résistance de trois allergènes du lait de vache : la blg, la caséine et la sérum albumine bovine (SAB).

La blg, un allergène majeur du lait, est résistant lors de la digestion gastrique, mais est labile lors de la digestion intestinale (Fu et *al.*, 2002). Les mêmes résultats ont été obtenus par Thomas et *al.* (2004) et Astwood et *al.* (1996), qui ont observé la persistance de cet allergène entier même après 60 minutes de digestion gastrique. A l'inverse, l' $\alpha$ -caséine, un autre allergène majeur du lait, est rapidement dégradé lors de la digestion par les enzymes gastriques, notamment la pepsine, tandis que la SAB, un allergène mineur du lait, est moins rapidement dégradé (Fu et *al.*, 2002) (Thomas et *al.*, 2004). Ces résultats étaient en contradiction avec ceux de Astwood et *al.* (1996) démontrant une stabilité de moins de 30 secondes pour cette protéine.

- La résistance à la digestion gastro-intestinale des allergènes de l'arachide

Tout comme pour le lait de vache, plusieurs études aux résultats discordants ont été menées sur l'effet de la digestion gastrique et intestinale sur les allergènes de l'arachide.

Kopper et *al.* (2004) ont démontré que la digestion gastrique d'arachide crue et grillée provoquait la dégradation de protéines de masse moléculaire élevée en petits fragments résistants à des dégradations supplémentaires. Les profils de digestion obtenus avec un fluide gastrique de porc et avec la pepsine étaient de plus identiques, démontrant qu'il est donc possible de simuler la digestion gastrique en utilisant une solution de pepsine.

La résistance à la dégradation digestive a été menée sur deux allergènes, Ara h 1 et Ara h 2. Selon Astwood et *al.* (1996), Ara h 1 reste stable durant 60 minutes dans un système mimant la digestion gastrique tandis que Fu et *al.* (2002) et Kopper et *al.* (2004) n'ont observé qu'une faible résistance de cet allergène à la digestion gastrique. Toutefois, les fragments d'hydrolyse obtenus peuvent conserver une taille importante (environ 10 kDa) et contenir plusieurs sites de reconnaissance par les IgE (Maleki et *al.*, 2000). Ces épitopes linéaires ont pu être finement localisés dans les zones de contact des monomères d'Ara h 1 et semblent être protégés en partie de la digestion par la formation des homotrimères. Les auteurs en concluent

que la formation des homotrimères d'Ara h 1 protège les protéines de la digestion enzymatique et de la dénaturation, permettant ainsi le passage de fragments d'Ara h 1 contenant de nombreux sites de liaison aux IgE à travers la barrière intestinale, contribuant ainsi à l'allergénicité de cette protéine.

Dans l'étude de Thomas et *al.* (2004), parmi les 9 laboratoires ayant réalisé les mêmes tests de digestion d'allergènes alimentaires, 7 équipes ont observé qu'Ara h 2 présentait un fragment résistant de 10 kDa dès les premières minutes de digestion. Dans une autre étude, Ara h 2 était également dégradé en 30 secondes dans un fluide gastrique de simulation contenant de la pepsine mais également dans un fluide de simulation de digestion intestinale (Fu et *al.*, 2002). Ces résultats diffèrent de ceux observés par Sen et *al.* (2002) et Astwood et *al.* (1996) pour lesquels Ara h 2, sous forme native, était résistant à la digestion par la pepsine, respectivement après 20 et 60 minutes. La discordance peut être en partie expliquée par la préparation de l'allergène, Ara h 2 étant mis en présence d'agents réducteurs tels que le DTT dans l'étude de Fu et *al.* (2002). Or, Sen et *al.* (2002) ont montré que les ponts disulfures d'Ara h 2 contribuent significativement à la structure globale d'Ara h 2 et surtout à sa stabilité. S'ils sont réduits, Ara h 2 est dégradé rapidement par les enzymes gastro-intestinales dont la pepsine. Un point important lors de l'étude de la digestibilité des allergènes alimentaires est donc de considérer si la protéine testée est présente dans sa conformation native telle qu'elle se trouve dans l'aliment ou dans sa forme dénaturée. Il est important d'étudier l'aliment entier, et en particulier l'allergène au sein de cet aliment, en comparaison avec le même allergène purifié afin de tenir compte de l'effet protecteur de la matrice alimentaire sur la protéine seule.

## 5. Conclusion

Pour l'arachide et le lait de vache, des simulations de digestions gastriques et intestinales ont pu être réalisées. Il a été décidé de travailler également sur des digesta de yaourt, en parallèle aux digesta de lait, afin d'évaluer l'effet de la digestion sur l'immunoréactivité d'un produit issu de la transformation du lait de vache et fortement consommé. Des digestions gastriques *in vivo* ont également été menées après obtention des autorisations nécessaires. Nous pourrons ainsi comparer des simulations de digestions et des processus physiologiques, permettant de valider les modèles de digestion *in vitro* développés. Il nous sera également possible de

comparer le comportement de deux aliments, le premier d'origine animale (le lait de vache) et le second d'origine végétale (l'arachide), aliment dont la prévalence, l'incidence et les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire sont différentes. Dans ce programme, nos travaux ont consisté à évaluer la capacité de liaison des IgE de patients allergiques sur les différents aliments, suite aux différentes étapes de digestion. Les différents échantillons (aliments, sérums...) ont été obtenus auprès des différents partenaires du programme européen. A partir des techniques déjà développées au laboratoire, nous avons mis au point les tests d'inhibition nécessaires à l'étude de l'immunoréactivité des différents échantillons. De même, nous avons échangé nos techniques de purification des allergènes de l'arachide (présentées dans le premier chapitre de ce manuscrit) avec les partenaires responsables de mener la digestion des allergènes purifiés.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Sérums**

L'effet de la digestion sur l'allergénicité des aliments analysé dans le cadre du programme européen Allergest a impliqué des sérums obtenus auprès des partenaires Autrichiens (Dr. Zsolt Sepfalusi, Department of Pediatrics and Juvenile Medicine, Medical University, Vienna) et Grecs (Dr. Photini Papageorgiou, P&A Kyriakou Children's Hospital Department of Pediatrics, Allergy Unit, Athens). Il s'agit de sérums de patients allergiques à l'arachide ou au lait de vache dont l'allergie a été confirmée par des tests cliniques positifs.

Tous les détails de cette sérothèque (âge du patient, sexe, symptomatologie clinique, autres allergies), sont répertoriés dans les tableaux de l'annexe IV.

### **2. Modèle de digestion gastrique et de digestion duodénale (*in vitro* et *in vivo*)**

Les digestions *in vitro* ont été mises au point et effectuées à l'IFR de Norwich (Grande-Bretagne) par l'équipe du Dr. Clare Mills, grâce à la collaboration établie lors du programme européen Allergest. Les échantillons utilisés pour les digestions sont du lait de vache fourni par le partenaire polonais du programme européen (Dr. Piotr Kolakowski, Rhodia Food Biolacta Spolka, Pologne) et du yaourt préparé à partir de ce même lait fermenté avec la souche MYB 106 par ce même partenaire. Les extraits d'arachide ont été envoyés par le partenaire Israélien du programme européen et Ara h 1 a été purifié à partir de l'extrait d'arachide décrit ci-dessus selon le protocole détaillé dans le premier chapitre.

Les protocoles employés sont détaillés ci-après.

**a) Modèle de digestion *in vitro***

**(a) Enzymes**

Pepsine : La pepsine a une activité spécifique de 3250 unités par milligramme de protéine.

L-phosphatidylcholine : La phosphatidylcholine (PC) d'œuf de grade 1 est préparée sous forme de vésicules comme décrit par Moreno et *al.* (2005).

Le fluide de simulation gastrique (SGF) est maintenu à pH 2,5. Il est composé de NaCl à 0,15M ajusté au pH 2,5 avec une solution de HCl à 1 M.

Trypsine de porc: La trypsine a une activité spécifique de 172500 unités par milligramme de protéine.

Chymotrypsine bovine: La chymotrypsine a une activité spécifique de 500 unités par milligramme de protéine.

Lipase pancréatique de porc : La lipase a une activité de 25600 unités par milligramme de protéine.

Colipase pancréatique de porc : La colipase a une activité de 26000 unités par milligramme de protéine.

Le fluide de simulation intestinale (SIF) est maintenu à pH 6,5. Il est composé de 7,4 mM de sels biliaires (taurochlorate de sodium et acide glycodéoxycholique), 9,2 mM de CaCl<sub>2</sub> et 24,7mM de Bis Tris pH 6,5.

**(b) Digestion gastrique (phase 1)**

Les échantillons (aliments entiers ou allergènes purifiés) sont mis en solution dans du fluide gastrique de simulation (SGF) selon une concentration protéique de 50 mg.ml<sup>-1</sup>.

La pepsine est ajoutée extemporanément dans le SGF à raison de 2,5 mg.ml<sup>-1</sup>. Les digestions sont réalisées à 37°C pendant 2 h, sous agitation, en présence ou non de phosphatidylcholine (PC). Des aliquots des digesta prélevés avant l'addition de pepsine et après plusieurs temps de digestions (de 1 à 120 minutes) sont neutralisés par 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium à 0,5 M pour élever le pH à 6,8 – 7,0 et inactiver irréversiblement la pepsine. Initialement, des digestions à « petite échelle » sont réalisées pour un volume total de 10 ml. Des digestions à grande échelle ont été réalisées pendant 120 minutes et arrêtées par élévation du pH à 7,5 à l'aide d'une solution de NaOH à 1 M. Des échantillons contrôles sans ajout de pepsine ont également été préparés.

### **(c) Digestion duodénale (phase 2)**

La digestion duodénale est réalisée sur les digesta gastriques. Le pH est ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de HCl à 1 M. Les solutions de lipase et de colipase pancréatique de porc, diluées respectivement aux ratios 1/500 et 1/250 (volume/volume) dans du fluide de simulation intestinale (SIF), sont ajoutées au mélange. Les solutions de trypsine et de chymotrypsine diluées dans une solution de NaCl 0,15 M pH 7,0 sont ajoutées aux ratios respectivement de 0,0025/1 et 0,01/1 (poids/poids) par rapport à la masse de protéines digérées.

La digestion est réalisée à 37°C pendant 2 h, sous agitation, en présence ou non de PC. La cinétique de digestion est suivie par des prélèvements à différents temps (de 1 à 120 minutes) pour les analyses ultérieures. Pour chaque prélèvement, la digestion est arrêtée par addition d'une solution d'inhibiteur de trypsine et de chymotrypsine Bowman-Birk. La concentration d'inhibiteur ajoutée doit permettre d'inhiber le double du taux de trypsine et de chymotrypsine présent dans le milieu. Des échantillons contrôles sans ajout de trypsine et de chymotrypsine ont également été préparés.

Il faut noter que dans ces expériences, les produits issus de la phase de digestion gastrique (phase 1) ne correspondent pas aux produits de départ pour la digestion duodénale (phase 2). Les expériences ont été menées en parallèle sur deux aliments de départ, la digestion duodénale survenant immédiatement après la digestion gastrique sans effectuer un prélèvement d'échantillons. De ce fait, à chaque processus de digestion correspond un témoin bien distinct.

Tous les échantillons ont été congelés à -20°C pour les envois et conservés à cette température avant l'étude de leur immunoréactivité.

### ***b) Digestion gastrique in vivo***

#### **(a) Principe**

Avec tous les accords nécessaires pour réaliser ces expériences (ETHICS N° NDEC Ref. 2002-3/036), les partenaires de l'IFR ont réalisé des prélèvements gastriques à différents

temps chez des volontaires sains non allergiques après l'ingestion d'extrait d'arachides crues ou de lait de vache. Les échantillons ainsi prélevés vont nous permettre d'étudier l'évolution de l'immunoréactivité des protéines au cours de la digestion gastrique, *in vivo*, études qui n'ont jamais été réalisées à ce jour.

Les aliments à ingérer, lait ou arachide, sont administrés à des volontaires et 10 ml du contenu gastrique sont aspirés toutes les 15 minutes sur un intervalle de 2 heures. Les échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour les analyses ultérieures.

#### **(b) Réactifs**

Rouge Phénol, bicarbonate de sodium : Sigma (Dorset, GB).

Eau stérile

Tous ces réactifs ainsi que les arachides crues (provenant du partenaire Israélien) et la poudre de lait écrémé (provenant du partenaire Polonais) sont de qualité alimentaire (Food Grade).

#### **(c) Mode opératoire**

- Solution Rouge Phénol : 40 mg de rouge phénol sont ajoutés à 150 ml d'eau distillée dans laquelle 100 mg de bicarbonate de sodium ont été préalablement dissous. Cette solution est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,22 µm.
- Préparation de la solution d'arachides à ingérer : 40 g d'arachides sont broyés et additionnés à 320 ml d'eau stérile. La solution est homogénéisée à l'Ultra-Turrax (type 25 avec une mèche S25N18G) pendant 20 minutes. Une minute avant la fin de l'homogénéisation, 5 ml de solution de rouge phénol sont ajoutés. Dix millilitres de cette solution sont conservés comme solution de contrôle. Les 350 ml restant qui contiennent environ 10 g de protéine (en se basant sur la quantité théorique protéique de 25% pour la graine d'arachide) constituent la solution à ingérer.
- Préparation de la solution de lait de vache à ingérer : 60 g de poudre de lait écrémé sont ajoutés à 400 ml d'eau stérile. Le mélange est homogénéisé à l'Ultra-Turrax (type 25 avec une mèche S25N18G) pendant 5 minutes. Une minute avant la fin de l'homogénéisation, 5 ml de solution de rouge phénol sont ajoutés. Cinquante millilitres de ce mélange sont conservés comme solution contrôle et le volume restant

constitue la solution d'ingestion pour un volontaire contenant de 12 à 14 g de protéines.

- Aspiration des échantillons gastriques : les échantillons sont aspirés par un tube nasogastrique. Les premiers 10 ml sont aspirés et le tube est rincé avec 10 ml d'eau stérile. Les échantillons suivants sont obtenus par l'aspiration de 10 ml de volume non conservé suivie de l'aspiration de 10 ml d'échantillons. Le tube est nettoyé avec de l'eau stérile.

Les autorisations éthiques autorisent des prélèvements sur 2 heures à intervalles de 15 minutes. Mais pour certains patients, il n'a pas été possible d'obtenir les derniers temps de prélèvement, l'estomac étant vide.

### **3. Analyses électrophorétiques**

La composition protéique des différents extraits est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (SDS PAGE) suivant le protocole décrit dans le premier chapitre.

### **4. Evaluation de la quantité des protéines dans le lait : la blg et les caséines**

#### ***a) Dosage de la $\beta$ -lactoglobuline (blg)***

La quantité de  $\beta$ -lactoglobuline est déterminée par un test immunométrique.

La purification de la blg standard, les procédures d'immunisation par la production des anticorps monoclonaux et la mise au point du test immuno-enzymatique ont été réalisées au laboratoire et décrites par Negroni et *al.* (1998).

Le dosage fait intervenir un premier anticorps immobilisé sur la phase solide assurant la capture de la blg. Un second anticorps complémentaire du premier est utilisé en tant que traceur après couplage à l'AcHé. La blg est ainsi « prise en sandwich » entre l'anticorps immobilisé et l'anticorps marqué.

**(a) Tampons utilisés**

Les tampons utilisés ont été présentés dans le chapitre 1 (pages 80 et 81).

**(b) Préparation des plaques**

L'anticorps de capture, un anticorps monoclonal spécifique de la blg native (MAb BLG-97N) Negroni et *al.* (1998) est adsorbé dans les puits de plaques de microtitration selon les conditions appliquées lors du chapitre 1 (page 81).

**(c) Détermination de la quantité de blg native dans les échantillons**

Cinquante microlitres de blg standard ou de dilution de l'échantillon à analyser sont mis en contact avec l'anticorps de capture immobilisé. L'anticorps traceur (MAb BLG-117N) est ajouté ( $50\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $2\text{ UE}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Plusieurs dilutions par échantillon sont analysées afin de la situer dans la gamme standard du dosage. Après 18 heures de réaction à  $+4^{\circ}\text{C}$ , les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages) et  $200\mu\text{l}$  de réactif d'Ellman sont déposés dans chaque puits (distributeur Labsystems Multidrop) et les lectures sont alors effectuées à une longueur d'onde de 414 nm (Labsystems Multiskan Bichromatic) à différents temps de révélation.

La quantification de la blg native dans les différents digesta est faite par comparaison avec une courbe dose-réponse obtenue avec la blg standard.

La limite de détection est de  $30\text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour la blg native avec une réaction croisée négligeable avec la blg dénaturée (inférieure à 0,018%), avec des fragments tryptiques de la blg (inférieure à 0,0005%) ou d'autres protéines du lait (inférieure à au moins 0,01%).

**b) Dosage des caséines entières**

La quantité de caséines entières dans les échantillons est évaluée par un dosage ELISA par compétition, mis au point au laboratoire.

**(a) Tampons utilisés**

Les tampons décrits pour le dosage de la blg sont également utilisés dans le dosage des caséines entières.

**(b) Préparation des plaques**

Des anticorps monoclonaux de souris anti-anticorps de lapin sont immobilisés dans les puits de plaques de microtitration selon les conditions évoquées dans le chapitre 1 (page 81).

**(c) Détermination de la quantité de caséines entières dans les échantillons**

Cinquante microlitres de saignées de lapin immunisé contre les caséines dilué au 1/2000, 50µl de caséines standard ou de dilution de l'échantillon et 50 µl de traceur sont mis en contact avec l'anticorps de capture immobilisé. Plusieurs dilutions de l'échantillon sont réalisées et analysées. Le traceur consiste en de la caséine entière marqué à l'acétylcholinestérase, protocole décrit des pages 83 à 84, et est utilisé à 2 UE.ml<sup>-1</sup>. La caséine standard préparée au laboratoire (Bernard et *al.* (1998) est utilisée comme gamme étalon pour le dosage. Après 4 heures de réaction à température ambiante sous agitation, les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages) et 200 µl de réactif d'Ellman sont déposés dans chaque puits. Des lectures de densité optique sont alors effectuées à une longueur d'onde de 414 nm.

La quantification des caséines entières dans les différents digesta est ensuite réalisée par comparaison avec une courbe d'inhibition dose-réponse obtenue avec la caséine standard.

**5. Etude de l'immunoréactivité des digesta d'arachide et de lait**

Ces méthodes d'analyse de l'immunoréactivité (test direct, test par compétition et test pas compétition avec capture des IgE) ont été décrites dans le premier chapitre des pages 78 à 85.

### **III. Résultats et discussion**

#### **1. L'arachide**

##### ***a) Modèle in vitro de digestion gastrique et duodénale***

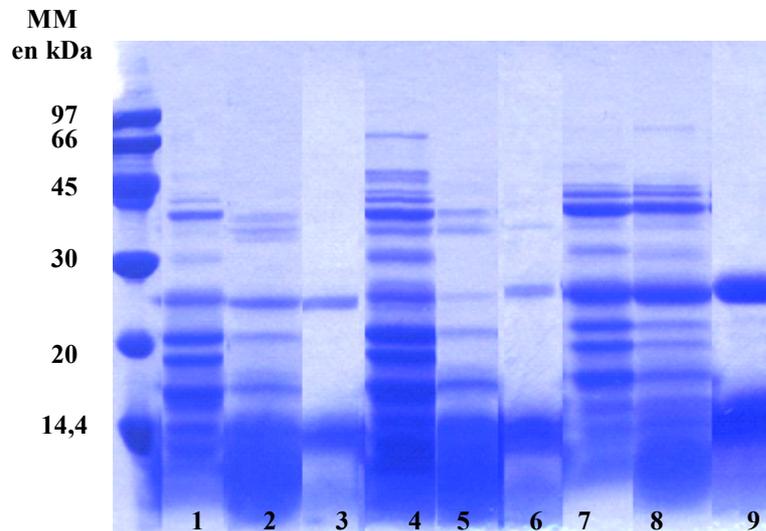
###### ***(i) Les extraits bruts d'arachide***

Différents échantillons nous ont été envoyés par l'IFR de Norwich correspondant à des extraits d'arachides crues, grillées et de beurre d'arachide ayant subi ou non une simulation de digestion gastrique en présence de pepsine, puis duodénale en présence de trypsine et de chymotrypsine. Il n'a pas été envisagé lors de ce programme européen l'étude de la digestion sur l'extrait d'arachide bouillie. Nous avons retenu l'arachide crue comme référence, l'arachide grillée (forme la plus consommée dans les pays occidentaux) et le beurre d'arachide (un produit de transformation des arachides grillées, fréquemment consommé aux Etats-Unis).

Nous avons comparé les profils obtenus suite à des électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices (figure 52). Chaque échantillon est déposé à la même concentration protéique, en se basant sur la quantité de protéines mises à digérer initialement.

Avant les digestions, tous les extraits d'arachides présentent des profils électrophorétiques (figure 52, puits 1, 4, 7) constitués de bandes protéiques de masses moléculaires comprises entre 14 et 66 kDa. A la suite de la digestion gastrique (figure 52, puits 2, 5 et 8), pour les extraits d'arachides grillées et crues, les entités protéiques de masse moléculaire supérieure à 40 kDa sont hydrolysées en fragments peptidiques de plus faible masse moléculaire. Pour le beurre d'arachide, nous observons une atténuation beaucoup moins importante des bandes protéiques de masses moléculaires élevées. Seule l'entité à environ 30 kDa semble efficacement dégradée. Lorsque cette digestion gastrique est suivie de la digestion duodénale (figure 52b), aucune protéine de masse moléculaire supérieure à 30 kDa ne persiste. L'extrait de beurre d'arachides présente une particularité : l'intensité d'une bande protéique de 25 kDa

reste très importante uniquement pour cet extrait. Cette bande protéique n'a pu être identifiée par des analyses de protéomique comme protéine de l'arachide. Il apparaît donc intéressant d'étudier l'immunoréactivité de ces trois extraits à la suite de la digestion gastrique puis de la digestion duodénale.



**Figure 52 : profil électrophorétique des extraits d'arachides grillées (1), crues (4), et de beurre d'arachide (7), après digestion gastrique, respectivement (2), (5) et (8) et après digestion gastro-duodénale, respectivement, (3), (6) et (9).**

Le même type d'analyses électrophorétiques a été réalisé avec les échantillons digérés en présence de PC. Les profils électrophorétiques obtenus sont similaires à ceux de la figure 52. La PC n'influe pas sur l'hydrolyse des protéines d'arachide par les différentes enzymes digestives.

L'immunoréactivité des différents extraits a été évaluée par des tests immuno-enzymatiques par compétition. A partir des courbes d'inhibition obtenues, nous avons calculé la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la liaison aux IgE spécifiques (IC50). Les différentes valeurs obtenues sont répertoriées dans le tableau 25. La population d'étude (n=5) étant hétérogène et limitée, nous ne réaliserons pas d'analyses statistiques. Nous observerons des tendances dans l'effet de la digestion sur l'immunoréactivité. Nous avons choisi de travailler avec ces 5 sérums car nous avons à disposition des volumes importants et leur intensité de réponse contre l'arachide brute était importante.

**Tableau 25 : Valeurs d'IC50 obtenues pour les extraits d'arachides crues et grillées et de beurre d'arachide à l'aide de 5 sérums de patients allergiques à l'arachide. P1 : phase gastrique, P1+2 : phase gastrique et duodénale, PC : phosphatidylcholine, E : enzyme.**

			IC 50 ( $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ )				
			2209	2305	2205	2208	2304
Arachides crues	P1	-PC-E	0,03	0,01	0,05	0,04	0,01
		-PC+E	0,05	0,05	1,00	0,05	0,07
		+PC-E	0,03	0,05	0,04	0,05	0,01
		+PC+E	0,05	0,05	1,00	0,06	0,09
	P1+2	-PC-E	0,05	0,06	2,00	0,15	0,07
		-PC+E	0,07	0,06	10,0	0,09	0,09
		+PC-E	0,04	0,05	1,00	0,08	0,07
		+PC+E	0,06	0,02	5,00	0,10	0,04
Arachides grillées	P1	-PC-E	0,03	0,01	0,10	0,03	0,05
		-PC+E	0,03	0,04	0,18	0,02	0,02
		+PC-E	0,03	0,01	0,10	0,05	0,05
		+PC+E	0,18	0,05	0,18	0,06	0,13
	P1+2	-PC-E	0,04	0,03	0,40	0,06	0,07
		-PC+E	0,05	0,03	2,10	0,09	0,08
		+PC-E	0,05	0,03	0,15	0,90	0,08
		+PC+E	0,06	0,03	1,80	0,09	0,15
Beurre d'arachide	P1	-PC-E	0,02	0,02	0,08	0,06	0,03
		-PC+E	0,05	0,03	0,18	0,06	0,07
		+PC-E	0,02	0,03	0,07	0,06	0,03
		+PC+E	0,05	0,03	0,06	0,06	0,08
	P1+2	-PC-E	0,05	0,03	0,80	0,20	0,07
		-PC+E	0,10	0,07	0,55	0,20	0,20
		+PC-E	0,05	0,04	0,41	0,12	0,07
		+PC+E	0,05	0,03	0,15	0,08	0,04

Des solutions contrôles ne contenant pas de protéine mais uniquement les enzymes de digestion et/ou la PC ne permettent pas d'inhiber la liaison IgE-protéines de l'arachide.

Tout d'abord, nous pouvons noter une variation des valeurs d'IC50 obtenues avec les extraits d'arachides grillées, crues ou beurre d'arachide non digérés (-PC-E de la phase 1) en fonction du sérum étudié. Ainsi, la concentration nécessaire à l'inhibition de 50% de la liaison IgE-protéines immobilisées (extrait d'arachides grillées) varie entre 0,01 à 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$  pour l'extrait d'arachides grillées. Cette variation est moins accentuée pour l'extrait d'arachides crues ou de beurre d'arachide respectivement d'un facteur 5 et 4.

Lors de la phase de digestion gastrique (phase 1), l'immunoréactivité des trois extraits (arachides crues, grillées ou bouillies) n'est que peu ou pas diminuée pour les sérums étudiés. Les valeurs d'IC50 sont en effet fortement conservées et les inhibitions obtenues avec les extraits dégradés sont proches des valeurs estimées avec les échantillons initiaux. De même, lors de la digestion duodénale, l'immunoréactivité des digesta n'est que très faiblement diminuée.

Les diminutions d'immunoréactivité les plus marquées sont observées lors des inhibitions impliquant les IgE du sérum 2205. Avec les autres sérums mais également pour les deux autres extraits, la diminution n'excèdent pas le facteur 9.

Lors des différentes phases de digestion, la phosphatidylcholine (PC) n'a aucun effet significatif sur l'immunoréactivité des digesta.

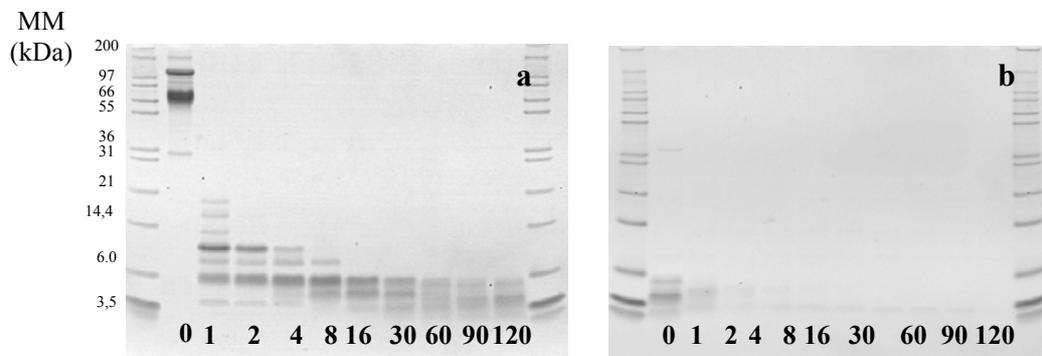
En conclusion, l'arachide crue, l'arachide grillée et le beurre d'arachide conservent pratiquement leur immunoréactivité après les digestions gastrique et duodénale. La PC n'a pas d'effet significatif sur l'immunoréactivité des digesta gastriques et duodénaux.

### (ii) L'allergène purifié Ara h 1

Après purification de l'allergène Ara h 1 à partir d'un extrait d'arachide grillée, une simulation de digestion gastrique puis duodénale a été menée en présence ou non de PC.

#### *Suivi de la dégradation d'Ara h 1 au cours des phases de digestion*

Les cinétiques de digestions de l'allergène ont été suivies par électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices (figure 53).



**Figure 53 : électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices des prélèvements d'Ara h 1 au cours de la digestion gastrique (a) et gastrique + duodénale (b) en absence de PC. Les temps de digestion en minute sont reportés en bas de chaque puits de dépôt. Pour la phase gastrique, temps 0 : Ara h 1 purifié. Pour la phase duodénale, temps 0 : solution d'Ara h 1 issue des 120 minutes de digestion gastrique.**

- Digestion gastrique

En absence de PC, la cinétique de digestion gastrique est représentée en figure 53a. Sur le contrôle avant digestion (t=0 minute), nous observons une bande de masse moléculaire d'environ 65 kDa qui correspond à l'allergène Ara h 1 intact. Deux bandes de masse

moléculaire plus importante, d'environ 120 kDa et 180 kDa, correspondent respectivement à l'homodimère et l'homotrimère d'Ara h 1 (Maleki et *al.* 2000). La bande à 36 kDa a été analysée par protéomique et identifiée à un fragment d'Ara h 1 (région 71-348). Dès la première minute de digestion gastrique, Ara h 1 est dégradé en fragments de faible masse moléculaire, de 6 à 20 kDa et cette dégradation se poursuit jusqu'à la disparition complète de fragments de masse moléculaire supérieure à 6 kDa après 120 minutes de digestion gastrique, le temps moyen de la digestion gastrique *in vivo* (figure 53a).

- Digestion duodénale

La dégradation enzymatique lors de la digestion duodénale suivant la digestion gastrique est analysée par SDS PAGE (figure 53b). Lors de cette digestion, la dégradation des fragments de faible masse moléculaire présents à la fin de la digestion gastrique se poursuit jusqu'à leur disparition totale.

Dans aucune des deux phases de digestion, les profils électrophorétiques réalisés en absence de PC ne diffèrent de ceux réalisés en présence de PC (résultats non montrés).

*Evolution de l'immunoréactivité au cours de la digestion gastro-duodénale*

L'allergénicité résiduelle des digesta a été évaluée par leur capacité à inhiber la liaison des IgE spécifiques à de l'Ara h 1 immobilisé. Cinq sérums ont été utilisés pour ces études. Les contrôles, à savoir les solutions des digesta obtenus dans des conditions identiques mais en absence d'Ara h 1, ne présentent aucune immunoréactivité et ne permettent pas de déplacer la liaison des IgE à l'Ara h 1 immobilisé. Les courbes d'inhibition obtenues avec les cinq sérums présentent des profils identiques. Sur la figure 54 sont représentées les courbes d'inhibition obtenues pour le patient 2205 par des doses croissantes d'Ara h 1 et par les doses correspondantes de digesta gastriques (120 minutes) et gastro-intestinaux (120 minutes) d'Ara h 1. Ces doses de digesta sont estimées en fonction de la quantité d'Ara h 1 qui a été mises à digérer.

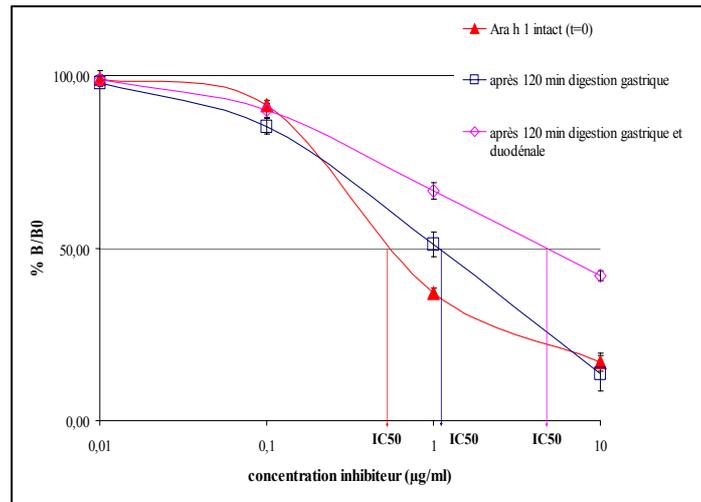


Figure 54 : courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques du sérum 2205 à l'Ara h 1 immobilisé par des concentrations croissantes de digesta gastrique d'Ara h 1 (120 min) et de digesta gastrique + duodénal d'Ara h 1 (120 min). Les déterminations sont effectuées en triplicat pour chaque dilution. Les concentrations du compétiteur sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  et l'inhibition en pourcentage B/B0, où B0 et B correspondent à la liaison des IgE spécifiques à l'Ara h 1 immobilisé respectivement en absence ou en présence d'une concentration connue de compétiteur.

Les digesta gastriques et gastro-intestinaux sont capables d'inhiber la liaison des IgE du patient à l'Ara h 1 immobilisé. La digestion gastrique ne diminue que légèrement l'immunoréactivité d'Ara h 1. Lors de la digestion gastro-intestinale, cette diminution est accentuée mais les digesta conservent tout de même une importante capacité d'inhibition de la liaison des IgE à Ara h 1.

Les valeurs d'IC50 des digesta gastriques et gastro-intestinaux déterminées à partir de ces courbes sont récapitulées dans le tableau 26.

Tableau 26 : valeurs d'IC50 exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  et obtenues lors des digestions gastriques et duodénales d'Ara h 1 à l'aide de 5 sérums de patients allergiques à Ara h 1. PC : phosphatidylcholine et E : enzymes.

		IC50 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (après 120 minutes de digestion)				
		2205	2208	2209	2304	2305
Digestion gastrique	-E-PC	0,8+/-0,1	3,1+/-0,6	1,1+/-0,3	1,4+/-0,1	1,0+/-0,2
	+E-PC	1,2+/-0,4	3,8+/-1,5	3,0+/-0,6	2,6+/-0,2	1,8+/-0,1
	-E+PC	0,7+/-0,1	2,9+/-0,3	1,1+/-0,1	1,2+/-0,2	0,9+/-0,04
	+E+PC	1,4+/-0,2	3,7+/-1,6	1,7+/-1,6	1,9+/-0,3	1,8+/-0,1
Digestion gastrique + duodénale	-E-PC	0,7+/-0,2	0,9+/-0,1	0,9+/-0,3	0,6+/-0,1	0,8+/-0,1
	+E-PC	3,9+/-0,6	4,5+/-0,4	2,4+/-0,2	2,3+/-0,3	2,3+/-0,1
	-E+PC	0,5+/-0,3	1,2+/-0,2	1,2+/-0,2	0,8+/-0,2	0,8+/-0,1
	+E+PC	4,9+/-1,1	5,4+/-0,6	3,2+/-0,5	3,8+/-0,3	2,5+/-0,4

Tout d'abord, nous pouvons noter qu'il n'y a aucune différence d'IC50 entre les digesta gastriques (-E+/-PC) et gastro-duodénaux (-E+/-PC) pour les sérums 2205, 2209, 2304 et 2305 tandis que pour le sérum 2208, nous pouvons noter une différence d'un facteur 4,5. N'ayant pas préparé les échantillons, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer cette différence. Aussi, nous analyserons les tendances d'évolution des IC50.

Les données individuelles confirment la tendance représentée en figure 54. La digestion gastrique effectuée en absence de PC engendre une légère augmentation des valeurs d'IC50. La PC ne modifie pas ces tendances. Les variations d'IC50 paraissent faibles et sont au mieux 2 fois plus fortes après addition d'enzyme. A titre d'exemple, pour le sérum 2205, l'IC50 initialement à  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  augmente à  $1,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Pour tous les patients, les variations d'IC50 sont plus importantes après digestion gastro-duodénale ce qui traduit une diminution de l'immunoréactivité d'Ara h 1. Pour le sérum 2205, ce phénomène est reflété par l'augmentation d'un facteur 5 des valeurs d'IC50.

Cependant, après le processus complet de digestion, Ara h 1 conserve une immunoréactivité résiduelle importante.

Au cours des deux phases de digestion, la PC ne modifie pas de manière significative l'immunoréactivité des digesta. Le profil électrophorétique étant identique en présence et en absence de PC, l'efficacité de la digestion n'est pas vraiment modifiée de façon importante.

Cependant, dans le cas des patients 2209 et 2304, la présence de PC semble diminuer l'effet de la digestion par la pepsine. Lors de la digestion duodénale qui suit la digestion gastrique, la présence de PC ne modifie que très légèrement l'effet de la digestion.

### *Conclusion*

L'ensemble de ces résultats traduit l'existence d'une immunoréactivité résiduelle d'Ara h 1 forte en dépit d'une dégradation totale de la protéine native observée en électrophorèse. L'immunoréactivité résiduelle peut être le fait des seuls peptides de faible masse moléculaire (<6 kDa) formés et/ou de leur association en polypeptides non visibles dans les conditions dénaturantes des électrophorèses présentées. Cette réduction d'immunoréactivité est cependant accentuée et plus significative lorsque la digestion gastrique est suivie par une digestion duodénale, cette seconde phase de digestion conduisant à la formation de peptides de plus faible masse moléculaire et/ou la dégradation des polymères peptidiques formés à la suite de la digestion gastrique.

En conclusion, les digestions gastriques et duodénales dégradent efficacement Ara h 1 mais génèrent des fragments peptidiques capables de lier les IgE. Les différences de reconnaissance des échantillons hydrolysés et non hydrolysés suivant les patients, traduisent la variabilité en terme d'affinité et de spécificité de la réponse IgE dans la population d'étude.

### ***b) Modèle in vivo : la digestion gastrique de l'arachide***

#### ***(i) Analyse des digesta de l'arachide crue***

La digestion gastrique de l'arachide crue a été réalisée sur 6 volontaires sains et non allergiques. Pour ces 6 volontaires, la cinétique de digestion de l'extrait d'arachide a été suivie par des prélèvements gastriques réalisés toutes les 15 minutes et analyse de ces prélèvements par des électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices. Parmi les 6 cinétiques réalisées, nous avons distingué deux types de profils différents présentés sur la figure 10 : le profil 2 (B), profil de digestion que nous avons défini comme étant rapide et le profil 6 (F), profil de digestion plus lente. Pour certains prélèvements, les quantités de protéines étaient plus faibles (temps 60 du profil 2 (B) et temps 75 du profil 6 (F), certainement du fait de la dilution des extraits par les fluides gastriques et/ou du fait de problème de prélèvements.

#### *Suivi de la dégradation des protéines au cours de la digestion*

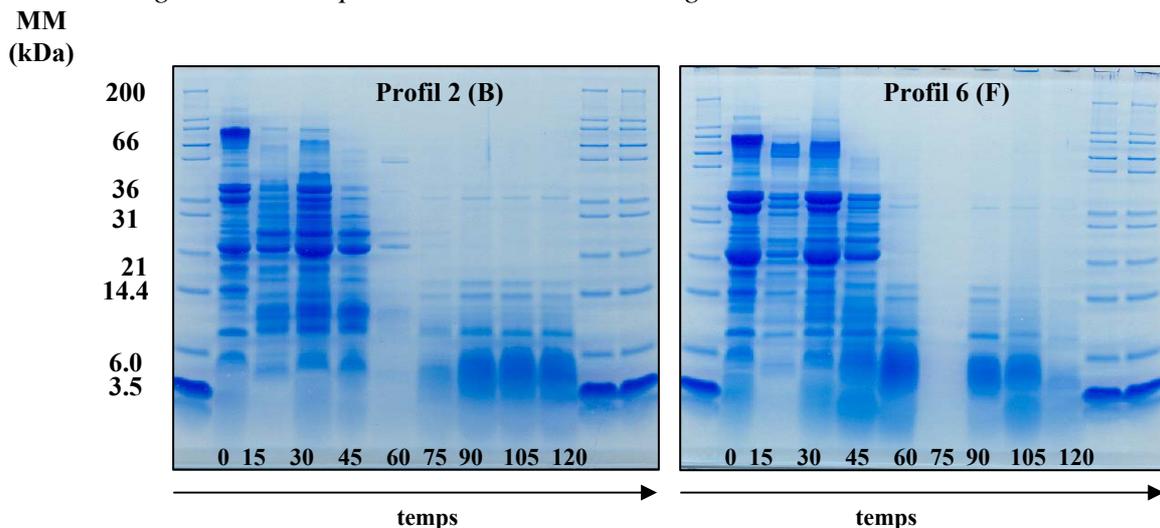


Figure 55 : électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices des différents prélèvements gastriques réalisés à différents temps (minutes) sur 2 volontaires différents représentatifs des 2 profils de digestion observés: profil 2 (B) et profil 6 (F).

Pour des problèmes d'homogénéité lors des prélèvements, certains échantillons présentent des profils faiblement constitués de bandes protéiques et ne seront pas exploités.

Pour le profil 2 (B) (figure 55), dès 15 minutes de digestion gastrique, la bande correspondant à Ara h 1 (près de 66 kDa) s'atténue. Après 45 minutes de digestion gastrique, Ara h 1 et les autres entités protéiques de masse moléculaire élevée sont rapidement dégradées en fragments peptidiques de plus faible masse moléculaire, inférieure à 20 kDa. Entre 90 et 120 minutes, la digestion se poursuit mais le profil protéique n'est que peu modifié, seules les entités de masse moléculaire inférieure à 15 kDa étant visibles.

Le profil 6 (F) (figure 55) se distingue du précédent essentiellement au niveau de la dégradation des protéines de masse moléculaire importante. En effet, nous pouvons observer une dégradation plus lente pour Ara h 1 et les autres entités protéiques de masse moléculaire élevée. Jusqu'à 30 minutes de digestion gastrique, la bande correspondant à Ara h 1 montre une intensité constante. Après 45 minutes de digestion gastrique, Ara h 1 est totalement dégradé en fragments peptidiques de plus faible masse moléculaire mais les protéines de masse moléculaire proche de 30 kDa persistent. Celles-ci disparaissent à partir de 60 minutes de digestion. Lorsque la digestion est poursuivie jusqu'à 120 minutes, aucune bande protéique de faible masse moléculaire n'est visible contrairement au profil précédent (2B). Seuls des peptides de masse moléculaire inférieures à 10 kDa sont détectables.

#### *Suivi de l'immunoréactivité au cours de la digestion*

L'immunoréactivité des digesta gastriques a ensuite été évaluée par des tests ELISA par compétition à l'aide des 5 sérums de patients allergiques à l'arachide précédemment utilisés pour l'évaluation de l'effet de la digestion *in vitro*. Nous avons réalisé les expériences sur 4 temps de prélèvements (0, 15, 45 et 120 minutes) pour les profils 2 (B) et 6 (F). Ces temps représentent la variabilité des profils. Les courbes d'inhibition obtenues avec les cinq sérums présentent des profils identiques. Sur la figure 56, sont représentées les courbes d'inhibition obtenues pour le patient 2209.

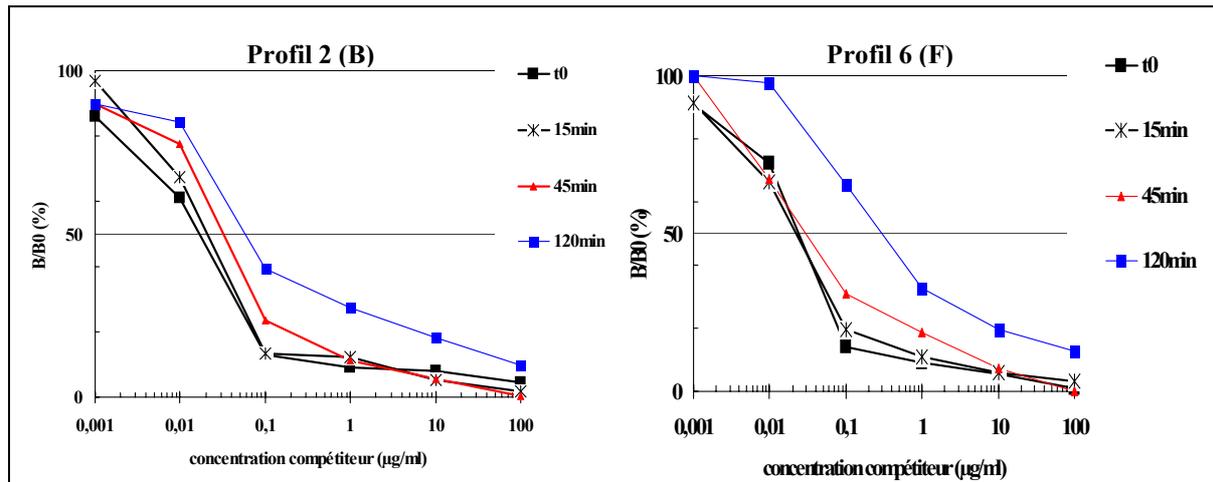


Figure 56 : courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques du sérum 2209 à l'extrait d'arachide crue immobilisé par des concentrations croissantes de digesta gastriques prélevés à différents temps de digestion *in vivo*. Les deux profils de digestion (rapide pour 2 (B) et lent pour 6 (F)) et sont représentés. Les concentrations d'inhibition sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tous les digesta inhibent la liaison des IgE spécifiques du patient 2209 à l'arachide. Pour les deux digesta gastriques, B et F, même après 45 minutes de digestion, l'immunoréactivité n'est pas modifiée. Après 120 minutes de digestion gastrique, la courbe d'inhibition reste parallèle à celle du contrôle (t0) mais les valeurs d'IC50 sont plus fortes, particulièrement pour le digesta F qui correspond à une plus forte dégradation de l'aliment (figure 56). Cette augmentation traduit une diminution de l'immunoréactivité du digesta. Il est cependant important de noter que, même après 120 minutes de digestion gastrique, les digesta conservent une immunoréactivité importante, proche de celle de l'aliment de départ.

Dans le tableau 27, nous avons récapitulé toutes les valeurs d'IC50 des digesta *in vivo* déterminées à partir de ces courbes pour les 5 sérums étudiés.

Tableau 27 : concentrations nécessaires pour inhiber la liaison des protéines de l'arachide immobilisées aux IgE spécifiques de 5 sérums de patients allergiques (IC50). Les compétiteurs sont les digesta gastriques de 2 volontaires à 4 temps de prélèvements (0, 15, 45 et 120 minutes). Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

	IC 50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )				
	2205	2208	2209	2304	2305
<b>B1 (t0)</b>	0,05	0,03	0,02	0,02	0,03
<b>B2 (t15 min)</b>	0,07	0,03	0,02	0,02	0,03
<b>B4 (t45 min)</b>	0,20	0,05	0,03	0,04	0,05
<b>B9 (t120 min)</b>	1,10	0,10	0,06	0,07	0,10
<b>F1 (t0)</b>	0,1	0,06	0,02	0,02	0,01
<b>F2 (t15 min)</b>	0,2	0,07	0,02	0,02	0,01
<b>F4 (t45 min)</b>	0,2	0,06	0,03	0,04	0,02
<b>F9 (t120 min)</b>	10	0,4	0,3	0,3	0,06

Pour les 5 sérums, nous observons des tendances identiques à celles commentées pour la figure 56. Les effets semblent plus marqués pour le sérum 2205. L'immunoréactivité des digesta gastriques obtenus de deux volontaires représentatifs (B et F) est légèrement diminuée après 120 minutes de digestion. Ce phénomène est reflété par l'augmentation d'un facteur 2 à 20. Mais après ces deux heures de digestion gastrique, l'immunoréactivité reste tout de même importante, avec des valeurs d'IC50 comprises entre 0,13 et 1,8  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

### *Conclusion*

La diminution de l'immunoréactivité des digesta gastriques *in vivo*, estimée par des tests par compétition, varie en fonction du sérum analysé. Ce phénomène pourrait traduire la spécificité et/ou l'affinité des IgE différentes entre les patients. Après 45 minutes de digestion, malgré la disparition des protéines de masse moléculaire élevée, l'immunoréactivité des digesta gastriques d'arachide n'est pas diminuée. La conservation apparente des protéines de faible masse moléculaire, probablement les allergènes Ara h 2 et Ara h 6, et de produits d'hydrolyse, à ce temps de digestion pourrait expliquer le « maintien » de l'immunoréactivité. Après 120 minutes de digestion gastrique *in vivo*, les protéines de faible masse moléculaire sont atténuées ou ont totalement disparues et l'immunoréactivité des prélèvements décroît de façon plus sensible. Il apparaît, en comparant les profils électrophorétiques des volontaires 2 (B) et 6 (F), que l'atténuation des bandes des protéines de faible masse moléculaire accompagne la baisse de l'immunoréactivité des digesta gastriques.

### ***(ii) Suivi de l'immunoréactivité des allergènes majeurs au cours de la digestion gastrique in vivo de l'arachide crue***

Pour le profil de digestion 2 (B) présenté en figure 55, nous avons étudié l'effet de la digestion sur l'immunoréactivité liée aux allergènes majeurs de l'arachide à savoir Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6. Nous avons utilisé le format de dosage par compétition avec capture des IgE. La liaison des allergènes de l'arachide marqués à l'AChE (Ara h 1-AChE, Ara h 2-AChE et Ara h 6-AChE) aux IgE capturées de patients allergiques à l'arachide est déplacée par des concentrations croissantes de digesta gastriques obtenus après des digestions *in vivo* de 0, 45 et 120 minutes.

Les courbes d'inhibition obtenues avec les IgE du sérum 2304 sont présentées en figure 57 et sont représentatives des courbes obtenues avec les cinq sérums.

Les différents prélèvements de digesta inhibent la liaison des IgE capturées aux allergènes: Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6 marqués à l'ACHÉ. Jusqu'à 45 minutes de digestion, les courbes d'inhibition sont totalement superposables ce qui traduit le fait qu'il n'y a aucune modification de l'immunoréactivité globale des allergènes Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6 au sein de la matrice alimentaire de l'arachide. A la fin de la digestion gastrique, soit à 120 minutes, les courbes d'inhibition sont toujours superposables pour les allergènes Ara h 2 et Ara h 6. Par contre, pour l'allergène Ara h 1, la courbe d'inhibition obtenue après 120 minutes de digestion est parallèle à celle du temps contrôle (t<sub>0</sub>) mais l'IC<sub>50</sub> est légèrement plus élevée. Cette augmentation de l'IC<sub>50</sub> (d'un facteur 4) traduit une diminution de l'immunoréactivité relative à Ara h 1 tandis que l'immunoréactivité liée aux allergènes Ara h 2 et Ara h 6 n'est pas modifiée.

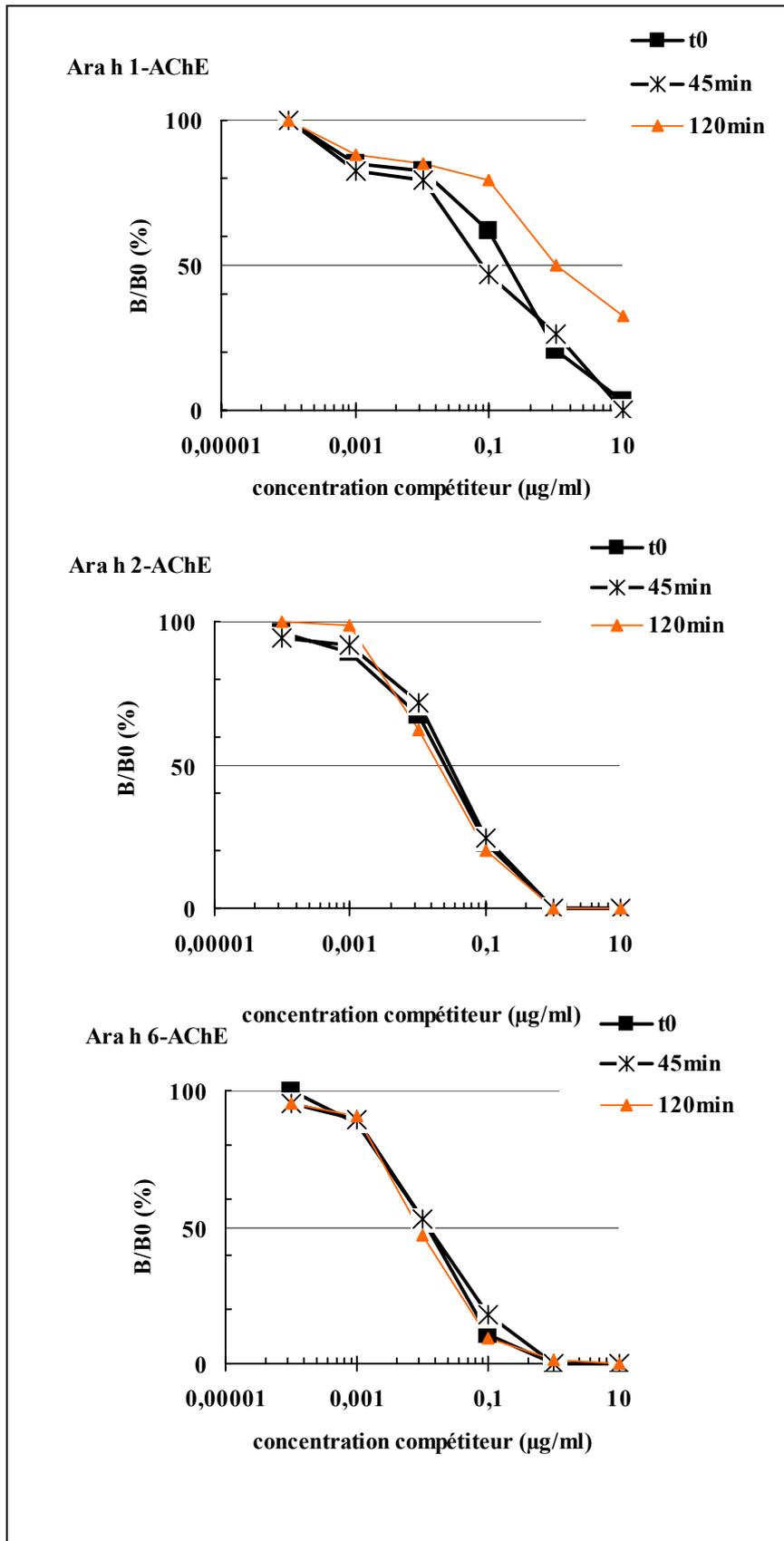


Figure 57 : courbes d'inhibition de la liaison des allergènes marqués à l'AChE (Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6) aux IgE capturées du sérum 2304 par des concentrations croissantes de digesta gastrique B obtenues à différents temps de prélèvements (0, 45 et 120 minutes). Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

### **c) Conclusion**

Nous avons étudié l'effet de la digestion gastro-duodénale *in vitro* et celui de la digestion gastrique *in vivo* sur l'arachide brute et ses allergènes. Lors de la digestion *in vitro* nous avons seulement observé une légère diminution de l'immunoréactivité de l'arachide crue qui est confirmée lors de la digestion *in vivo*. La comparaison des profils de digestion *in vitro* et *in vivo* obtenus ainsi que l'évolution de l'immunoréactivité au cours de ce processus permet de conclure que le modèle de digestion *in vitro* développé par l'IFR mime bien le processus physiologique autant en terme d'hydrolyse des protéines qu'en terme de persistance d'immunoréactivité.

Ce modèle de digestion peut donc être un outil pour l'analyse du comportement d'une protéine ou d'un aliment entier lors de la digestion.

La voie de sensibilisation aux allergènes alimentaires en général, et aux allergènes de l'arachide en particulier, n'est pas connue et la sensibilisation gastro-intestinale a été proposée. Dans cette « théorie », la résistance à la digestion est classiquement considérée comme un pré-requis pour qu'une protéine alimentaire soit un allergène.

Nos résultats concernant les digestions *in vitro* des extraits bruts d'arachides ainsi que celles de l'allergène purifié Ara h 1 conduisent à des conclusions divergentes par rapport à cette théorie : les digestions gastrique et gastro-duodénale dégradent rapidement les protéines de masse moléculaire importante en petits fragments peptidiques tandis que les protéines de faible masse moléculaire semblent moins affectées par cette digestion. Aucun des travaux publiés ne font état de l'évolution de l'immunoréactivité suite aux différentes phases de digestion (Fu *et al.*, 2002) (Sen *et al.*, 2002) (Kopper *et al.*, 2004) (Thomas *et al.*, 2004).

Tout d'abord, la variabilité individuelle de la réponse IgE des différents patients aux digesta suggère une différence de spécificité et/ou d'affinité des IgE aux épitopes de l'arachide selon les patients.

La digestion gastrique d'Ara h 1 engendre très rapidement son hydrolyse et l'apparition de fragments peptidiques de faible masse moléculaire. Cette dégradation est accentuée lors de la digestion duodénale. Les peptides résultant de ces hydrolyses conservent la capacité de lier les IgE et confèrent une immunoréactivité non négligeable aux digesta. Les partenaires autrichiens ont réalisés des expériences de dégranulations des basophiles, notamment avec la mesure du taux d'histamine libéré. Ces expériences ont révélé que les peptides issus de

l'hydrolyse d'Ara h 1 stimulaient autant la dégranulation des basophiles que l'allergène intact Ara h 1. Ces tests permettent d'asseoir le potentiel allergénique des digesta mis en évidence par les tests immuno-enzymatiques. Ainsi, en dépit des simulations de digestion gastrique et gastro-duodénale réalisées sur Ara h 1, la présence d'épitopes persiste. Cette conclusion peut être généralisée aux simulations de dégradations d'extraits d'arachide brute, notamment d'arachides crues, grillées et de beurre d'arachide.

L'effet de la digestion gastrique sur l'arachide entière a été récemment étudié par Kopper et *al.* (2004). Ces auteurs ont obtenu des profils de digestion similaires aux nôtres. D'autres études portant sur les allergènes purifiés de l'arachide, notamment Ara h 1 et Ara h 2, montrent des résultats semblables aux nôtres, les allergènes Ara h 2 et Ara h 1 étant rapidement dégradés par la pepsine, enzyme de la digestion gastrique, mais également par les enzymes intestinales, la trypsine et la chymotrypsine (Thomas et *al.*, 2004) (Fu et *al.*, 2002). Une résistance de l'allergène purifié à la digestion gastrique avait pourtant été observée par Sen et *al.* (2002). Des conditions d'hydrolyses différentes et particulièrement la différence de l'activité enzymatique de la pepsine pourraient expliquer la divergence des résultats.

Ainsi, dans nos études sur les fractions brutes d'arachide ainsi que sur un allergène modèle Ara h 1, nous avons pu observer que malgré une dégradation importante, il n'y avait pas de diminution drastique de l'immunoréactivité. Le maintien d'immunoréactivité peut être la résultante d'un équilibre entre la disparition d'épitopes de l'allergène natif et le démasquage de nouveaux épitopes lors de la digestion. Par ailleurs, certains éléments laissent suggérer le réarrangement des peptides de faible masse moléculaire ainsi formés en structures plus larges telles que des agrégats qui pourraient être dissociés à la suite du traitement dénaturant (SDS) et réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) du SDS PAGE. Des travaux récents ont décrit la capacité des peptides à former des agrégats avec des fonctions biologiques relevantes (Nichols et *al.*, 2005).

La PC qui fait partie de la famille des phospholipides, et est un composant majeur de la bile, a été utilisée lors des digestions *in vitro*. La présence de PC introduite pour se « rapprocher » des conditions *in vivo* n'interfère ni sur l'hydrolyse d'Ara h 1 et des autres protéines de l'arachide ni sur l'immunoréactivité des digesta.

Enfin, les digestions gastriques *in vivo* réalisées sur les extraits d'arachides crues, corroborent les informations fournies par les simulations de digestion *in vitro*. Tout d'abord, nous observons une dégradation forte des protéines de l'arachide avec tout de même la

conservation d'entités (protéines ou fragments peptidiques) de masse moléculaire comprise entre 20 et 30 kDa. Malgré ce phénomène, l'immunoréactivité des extraits ne disparaît pas et celle rapportées aux albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6) est conservée intégralement. Ces observations sont modulées en fonction des IgE du patient analysé ce qui implique des différences de spécificité et d'affinité.

Pendant la digestion, les protéines de masse moléculaire élevée et faible disparaissent mais l'allergénicité persiste. Nos travaux montrent que les propriétés allergéniques des protéines alimentaires peuvent être résistantes à la digestion, bien que les allergènes soient hydrolysés en peptides de faible masse moléculaire. Nous pouvons présumer que le réarrangement de peptides de faible masse moléculaire en complexes moléculaires de masse moléculaire plus importante serait responsable de ce phénomène. Des séparations en gel filtration et les caractérisations des fractions ainsi obtenues sont actuellement réalisées par les partenaires de l'IFR afin de mettre en évidence ces complexes peptidiques et nous permettre par la suite d'étudier leur immunoréactivité.

L'allergie à l'arachide est une allergie alimentaire sévère de par sa symptomatologie et le faible taux d'acquisition de tolérance. Elle s'accompagne d'un répertoire de protéines au potentiel allergénique conservé malgré leurs dégradations dans un système digestif. Il est intéressant de mener le même type d'analyse du devenir de l'immunoréactivité des protéines du lait de vache, une allergie alimentaire importante chez les jeunes enfants mais dont l'acquisition de tolérance avoisine les 80%.

## 2. Le lait

### a) *Modèle in vitro de digestion gastrique et duodénale d'aliments entiers : le lait et le yaourt*

Pour l'étude de l'effet de la digestion gastro-duodénale sur le lait de vache et un produit transformé issu du lait, le yaourt, nous avons suivi le devenir de deux allergènes majeurs du lait de vache, à savoir la blg et la caséine entière.

Pour des problèmes de résolutions, les images électrophorétiques réalisées avec les extraits de lait et de yaourt n'ont pas permis d'apporter des résultats clairs et ne seront pas exposés dans cette partie.

#### (i) *Analyse du contenu en blg*

La blg est quantifiée à l'aide d'un dosage immunométrique à deux sites développés et validés au laboratoire (Negroni et *al.*, 1998). Ce dosage permet la quantification de la blg sous sa forme native intacte. Aucune détection et donc aucune réaction croisée ne sont observées avec la blg dénaturée ou avec des fragments de blg.

Le contenu en blg native du lait et du yaourt préparé à partir de ce même lait a été analysé au cours de la digestion *in vitro* de la phase gastrique (P1) et gastro-duodénale (P1+2) en présence ou non de PC. Les valeurs représentant les pourcentages de blg par rapport à la concentration protéique totale (déterminée par dosage BCA) sont répertoriées dans le tableau 28.

**Tableau 28 : concentrations en blg dans les échantillons de lait et de yaourt aux différentes étapes de digestion. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de la concentration de protéine totale. PC : phosphatidylcholine, E : enzymes**

		blg en % de la concentration protéique totale	
		lait	yaourt
Digestion gastrique (P1)	-PC-E	7,5	0,03
	-PC+E	1,8	0,01
	+PC-E	6,2	0,03
	+PC+E	1,1	0,01
Digestion gastro-duodénale (P1+2)	-PC-E	2,2	0,02
	-PC+E	0,2	<0,01
	+PC-E	2,0	0,02
	+PC+E	0,4	<0,01

La concentration estimée dans le lait n'est pas retrouvée dans le yaourt. La différence de proportion est alors très importante, près d'un facteur 250. La faible présence de blg native dans le yaourt résulte de la fermentation lactique impliquant un chauffage à 37°C puis à 42°C et des dégradations enzymatiques.

La digestion gastrique du lait provoque une diminution d'un facteur 4 de la concentration de blg native sous l'action de pepsine en présence ou non de la phosphatidylcholine (PC). Lors de la digestion gastro-duodénale, la concentration de blg continue de diminuer significativement. L'absence de différence entre les digesta contenant ou non de la PC indique que ce phospholipide biliaire n'a aucun effet sur la digestion de la blg par la pepsine.

Lors de la digestion gastrique du yaourt, la concentration en blg native diminue d'un facteur 3 sans aucun effet de la PC. Cette dégradation de la blg se poursuit lors de la digestion gastro-duodénale pour atteindre un taux de blg native très faible, dans la limite de détection établie à 30 pg.ml<sup>-1</sup> (Negroni et *al.*, 1998).

En conclusion, pour le lait comme pour le yaourt, nous avons pu observer que la blg est dénaturée ou dégradée au cours de la digestion. La phosphatidylcholine n'a aucun effet sur la digestion de la blg, quelque soit l'aliment et la phase de digestion.

***(ii) Analyse de l'immunoréactivité de la blg contenue dans les digesta de lait et de yaourt***

L'immunoréactivité résiduelle liée à la blg et à ses fragments a été évaluée dans les digesta de lait et de yaourt à l'aide de tests ELISA de type compétitif par capture des IgE. L'inhibition de la liaison des IgE à la blg-AChE est réalisée pour deux sérums de patients allergiques au lait de vache. A partir des courbes d'inhibition obtenues, nous avons à nouveau déterminé la concentration de digesta nécessaire pour inhiber 50% de la liaison de la blg native restant dans le lait et le yaourt aux IgE spécifiques de patients allergiques au lait de vache.

**Tableau 29 : concentrations d'échantillons de digesta nécessaires à l'inhibition de 50% de la liaison des IgE spécifiques à la blg. Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

	<i>Conditions de digestions</i>	IC50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pour les échantillons de lait		IC50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pour les échantillons de yaourt	
		sérums		sérums	
		M30	M35	M30	M35
<b>Digestion gastrique (P1)</b>	-PC-E	0,07	0,15	2	2
	-PC+E	0,53	0,81	47	>100
	+PC-E	0,10	0,33	2	2
	+PC+E	0,27	0,51	9	20
<b>Digestion gastro-duodénale (P1+2)</b>	-PC-E	0,20	0,75	1	2
	-PC+E	2,0	3,96	>100	>100
	+PC-E	0,42	1,20	2	3
	+PC+E	1,13	2,29	>100	>100

Tout d'abord, nous pouvons noter des différences entre les contrôles de digestion gastrique (-PC-E) et de digestion gastro-duodénale (-PC-E). Aucune explication ne peut être donnée pour justifier cette variation puisque les échantillons n'ont pas été préparés dans notre laboratoire. Les effets de chaque phase de digestion seront discutés en comparaison à leur contrôle respectif.

L'immunoréactivité liée à la blg est plus faible dans le yaourt. En effet, nous pouvons remarquer que les valeurs d'IC50 obtenus pour le contrôle yaourt (-PC-E en P1) sont plus fortes d'un facteur 13 à 28 que celles obtenues pour le contrôle lait (-PC-E en P1). Par contre, le rapport de la concentration en blg native entre les deux extraits était de 250. La différence de concentration en blg native entre le lait et le yaourt ne reflète pas la différence entre leur immunoréactivité. La dénaturation et/ou la dégradation induites par la fermentation lactique pourrait générer des fragments peptiques, certains étant susceptibles d'être reconnus par les IgE de patients allergiques au lait de vache.

La digestion gastrique diminue l'immunoréactivité du lait ainsi que celle du yaourt. La diminution d'immunoréactivité observée est plus marquée pour le yaourt que pour le lait.

La digestion gastro-duodénale réalisée sur le lait et sur le yaourt à l'aide de trypsine et de chymotrypsine conduit à une plus forte diminution d'immunoréactivité que la seule digestion par la pepsine, certainement du fait d'une dénaturation et dégradation plus accentuée de la blg (tableau 29).

Lors des digestions du lait, la phosphatidylcholine semble légèrement modifier l'hydrolyse et ses effets sur l'immunoréactivité de la blg : la diminution de l'immunoréactivité de la blg est

légèrement moins importante en présence de PC (valeurs d'IC50 de 0,53 vs 0,27 et 0,81 vs 0,51 pour les deux sérums testés) lors de la digestion gastrique. La même observation peut être faite lors de la digestion gastro-duodénale.

Lors de la digestion gastrique du yaourt, la diminution de l'immunoréactivité est nettement moins importante en présence de PC, alors que l'ajout de celle-ci n'avait pas d'effet sur le dosage de la blg native présente dans les échantillons. Par contre, l'ajout de la phosphatidylcholine au cours de la digestion gastro-duodénale ne permet pas d'atténuer cette perte d'immunoréactivité du yaourt.

Ainsi, la blg est sensible à la protéolyse dans un contexte de digestion gastro-intestinale, milieu favorisant sa dénaturation. Cette dénaturation et/ou cette dégradation conduisent à une diminution de l'immunoréactivité de la protéine native.

**(iii)Analyse du contenu en caséines entières**

Le contenu des caséines, protéines les plus abondantes du lait et du yaourt, a été évaluée dans les différents échantillons à l'aide du test EAST décrit des pages 180 à 181. La quantité de caséine a été rapportée en pourcentage après estimation des protéines totales (par un dosage BCA). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 30.

**Tableau 30 : concentrations de caséines entières, exprimées en pourcentage de protéines totales déterminées par le test BCA, dans les échantillons de lait et de yaourt lors des différentes étapes de digestion. PC : phosphatidylcholine, E : enzymes.**

		caséine en % de la concentration protéique totale	
		lait	yaourt
<b>Digestion gastrique (P1)</b>	<b>-PC-E</b>	87	93
	<b>-PC+E</b>	30	3
	<b>+PC-E</b>	88	93
	<b>+PC+E</b>	41	7
<b>Digestion gastro-duodénale (P2)</b>	<b>-PC-E</b>	73	78
	<b>-PC+E</b>	18	2
	<b>+PC-E</b>	60	77
	<b>+PC+E</b>	17	4

Dans le cas de la caséine entière, aucune différence n'est observée entre les contrôles lait (-PC-E, en P1) et yaourt (-PC-E, en P1).

La concentration en caséine entière est diminuée d'un facteur 2 et 4 après respectivement la digestion gastrique et la digestion gastro-duodénale du lait. A la fin de cette digestion, la proportion de caséine entière détectable par notre test diminue à 17 et 18% des protéines totales. La PC n'a aucun effet sur la digestion des caséines.

Le yaourt reproduit les phénomènes observés pour le lait. Au cours des différentes phases de digestion, la caséine entière est presque entièrement dégradée, 2 à 7% de caséine entière étant encore détectables. Cependant, la diminution de la concentration en caséine entière est plus accentuée dans les digesta de yaourt en comparaison aux digesta de lait. La dénaturation par la fermentation lactique semble donc favoriser légèrement la dégradation de la caséine entière.

*(iv) Analyse de l'immunoréactivité de la caséine entière*

L'immunoréactivité des caséines entières des échantillons de lait et de yaourt lors des différentes étapes de la digestion a été analysée par des tests ELISA de type compétitif à l'aide de deux sérums précédemment utilisés pour l'étude de la réponse IgE à la blg. Un troisième sérum, dont la réponse IgE est spécifiquement dirigée contre la caséine entière, est également intervenu dans l'analyse de l'immunoréactivité de la caséine entière. A partir des courbes d'inhibition, les concentrations de digesta nécessaires pour inhiber 50% de la liaison des caséines entières immobilisées aux IgE spécifiques de patients allergiques au lait ont été déterminées (tableau 31).

**Tableau 31 : concentrations nécessaires d'échantillons de lait et de yaourt et de leur digesta pour inhiber 50% de la liaison des IgE à la caséine entière. Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .**

	Conditions de digestion	IC50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) pour les échantillons de lait			IC50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) pour les échantillons de yaourt		
		sérums			sérums		
		M30	M35	M37	M30	M35	M37
<b>Digestion gastrique (P1)</b>	-PC-E	<0,01	0,01	<0,01	0,9	0,2	0,1
	-PC+E	0,02	0,04	0,02	64,5	11,0	19,7
	+PC-E	0,03	0,03	0,01	0,7	0,3	0,2
	+PC+E	0,06	0,05	0,01	15,6	1,9	1,9
<b>Digestion gastro-duodénale (P1+2)</b>	-PC-E	0,01	0,03	0,02	0,9	0,1	0,2
	-PC+E	0,85	1,15	0,40	>100	>100	>100
	+PC-E	0,02	0,03	0,01	1,2	0,3	0,2
	+PC+E	0,6	1,97	0,44	>100	>100	45,8

Tout comme pour la blg, nous observons que les valeurs d'IC50 pour les contrôles yaourt (-PC-E, P1) sont supérieures d'un facteur 10 à 100 à ceux du lait. Etant donné les teneurs relatives semblables en caséines de yaourt par rapport au lait, il semble que la fermentation lactique conduirait à une diminution de la reconnaissance par les IgE soit par dénaturation partielle lors de la formation du coagulum soit par dégradation enzymatique partielle. Par

contre, ces deux phénomènes n'altèrent pas notre quantification des caséines effectuée par dosage immuno-enzymatique.

La digestion gastrique du lait n'apporte pas de modification importante de la reconnaissance par les IgE de la caséine entière. Cette observation est valable en présence ou non de PC. Par contre, lors de la digestion gastro-duodénale, la diminution de l'immunoréactivité des caséines du lait est fortement accentuée quelque soit le sérum considéré. Elle est reflétée par une augmentation des valeurs d'IC50 d'un facteur 20 à 85, sans aucun effet de la PC.

Pour le yaourt, lors de la digestion gastrique, les valeurs d'IC50 sont plus fortes pour les digesta, traduisant une immunoréactivité diminuée d'un facteur 55 à 197 en fonction du sérum lorsque le yaourt est digéré par la pepsine. Cette diminution, observée pour les 3 sérums testés, est beaucoup plus importante que celle observée pour le lait. Il est à noter que cette diminution de l'immunoréactivité est moins importante lorsque la PC est présente dans le milieu de digestion. Lors de la digestion gastrique et duodénale, les valeurs d'IC50 sont très élevées pour les digesta (IC50 supérieures à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) ce qui traduit que l'immunoréactivité des caséines entières est totalement abolie lorsque le yaourt est digéré par la trypsine et la chymotrypsine alors que les caséines représentent encore 2 à 4% des protéines présentes dans le digesta (tableau 31). L'ajout de PC est insuffisant pour compenser la perte d'immunoréactivité. La diminution de l'immunoréactivité est plus accentuée pour le yaourt que pour le lait. Les caséines entières seraient plus sensibles à la protéolyse après fermentation en présence de bactéries lactiques.

#### **(v) Conclusion**

En fonction du sérum, nous pouvons observer un phénomène d'hétérogénéité de réponse IgE anti-blg et anti-caséine pour l'échantillon contrôle mais également une hétérogénéité de l'effet de la digestion sur l'immunoréactivité de ces deux allergènes. Ce phénomène traduit la spécificité des IgE de chaque sérum de patients allergiques.

Nous observons que la concentration initiale en blg native dans le yaourt est largement inférieure (facteur 250) à celle du lait. Le processus intervenant lors de la préparation du yaourt, à partir du lait et de bactéries lactiques, fait intervenir un chauffage et une hydrolyse

enzymatique par les enzymes bactériennes. Or, la blg est une protéine sensible à la chaleur et la perte de sa conformation l'exposerait plus facilement à la protéolyse. Le dosage mis en œuvre dans nos études est un dosage spécifique de la forme native de la protéine, où les deux anticorps monoclonaux (de capture et traceur) reconnaissent des épitopes conformationnels de la protéine. Il est donc normal d'observer une diminution de la concentration de la blg après une dénaturation de la protéine par les bactéries lactiques qui vient s'ajouter à une perte relative en protéine du lactosérum.

Cette observation est appuyée par la différence d'affinité que nous obtenons entre les contrôles lait et yaourt (-PC-E, P1) pour les deux sérums étudiés.

L'effet de la digestion gastrique sur les allergènes du lait a été étudié par différentes équipes (Fu et al., 2002), (Thomas et al., 2004) (Astwood et al., 1996). Ces auteurs ont notamment montré que la blg, allergène majeur du lait de vache, présente une résistance relative lors de la digestion gastrique *in vitro* mais est labile lors de la digestion duodénale. L' $\alpha$ -caséine est rapidement dégradée lors de la digestion par les enzymes gastriques (Fu et al., 2002). Nos résultats sont conformes avec les travaux décrits précédemment. Lors des digestions gastrique et gastro-duodénale, les contenus en caséines entières et en blg du lait et du yaourt sont diminués. Cette dégradation est nettement plus accentuée lors de la digestion du yaourt. En effet, nous avons expliqué ci-dessus que la préparation d'un yaourt consiste en un procédé faisant intervenir deux paramètres, la chaleur et les enzymes. Nous avons déjà souligné que la blg, sous l'effet de la chaleur perd sa conformation. Quant aux caséines entières, elles ont peu de conformation et ont une structure très lâche qui les rend sensibles à l'hydrolyse enzymatique. Lors de la fermentation, les enzymes bactériennes peuvent donc également dégrader la protéine, favorisant ainsi les dégradations par les enzymes digestives.

En terme d'immunoréactivité, nous observons qu'après chaque phase de digestion, l'immunoréactivité de la blg et des caséines est diminuée pour le lait et pour le yaourt et que cette diminution est encore plus marquée pour le yaourt. Cette diminution est notamment marquée pour les caséines, corrélant avec leur plus grande sensibilité à la protéolyse, et résulte en une perte totale de l'immunoréactivité. Les mêmes raisons peuvent être avancées comme explication : la fermentation lactique fait intervenir les paramètres température et également la dégradation par les enzymes bactériennes. Le premier provoque la dégradation de la blg (perte des épitopes conformationnels) ce qui la rend ainsi sensible à la protéolyse. Le second agit sur les caséines qui sont très sensibles à l'hydrolyse enzymatique, résultant en une altération de leurs épitopes. Ces deux remarques permettent donc d'expliquer que la

---

diminution de l'immunoréactivité, c'est-à-dire la perte des épitopes reconnues par les IgE spécifiques, soit plus accentuée pour les protéines du yaourt.

Il est important de noter que la fermentation lactique intervenant lors de la préparation des yaourts déstructure les allergènes majeurs du lait, à savoir la blg et la caséine. Cet aliment paraît moins immunoréactif que le lait, sans tout de même perdre définitivement son immunoréactivité. Il est possible que des patients allergiques cliniquement au lait de vache puissent présenter une tolérance éventuelle au yaourt.

La phosphatidylcholine n'a aucun effet sur la digestion gastro-duodénale et l'immunoréactivité des digesta issus de cette phase. De même, lors de la seule digestion gastrique, la PC n'intervient pas sur la diminution de la quantité de blg et de caséines entières détectées par nos techniques de dosages. Par contre, la PC permettrait de limiter la diminution de l'immunoréactivité de la blg digérée au sein de l'échantillon de lait et de l'échantillon de yaourt, et celle des caséines entières au sein du yaourt. La PC ne joue donc un rôle que sur l'immunoréactivité de la blg et à une moindre mesure des caséines. Ce phénomène suggère que la blg et la caséine entière sont dénaturées voire dégradées à la suite de la digestion gastrique ce qui conduit à une détection impossible par un dosage spécifique tel que le dosage « sandwich » par deux anticorps monoclonaux de la blg, les IgE des patients allergiques conservant une capacité de reconnaissance de ces protéines dénaturées ou dégradées.

### ***b) Modèle in vivo : la digestion gastrique du lait***

La digestion gastrique du lait a été réalisée sur 6 volontaires sains et non allergiques. Pour ces 6 volontaires, la cinétique de digestion du lait, suivie par des électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices, a permis de mettre en évidence trois profils de digestions différents (figure 58). Pour deux volontaires, G et H, les prélèvements n'ont pas pu être poursuivis après 60 min et 105 min.

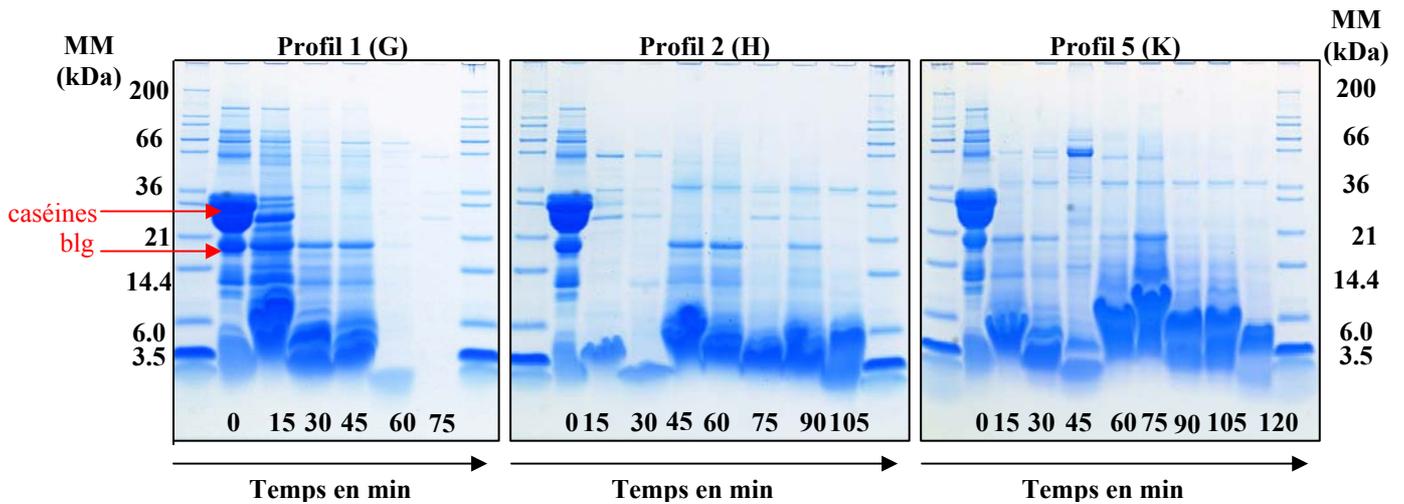


Figure 58 : électrophorèses en conditions dénaturantes et réductrices des prélèvements gastriques réalisés sur 3 volontaires différents : profil 1 (G), profil 2 (H) et profil 5 (K) à différents temps.

Le profil 1 (G) présente une dégradation lente des bandes de caséines et de blg, celles-ci étant toujours présentes à respectivement 15 et 45 minutes de digestion. Cependant, après 60 minutes plus aucune bande correspondant à ces protéines n'est observée. Seuls subsistent, à même quantité de protéine/peptide déposée, des fragments peptidiques de masse moléculaire inférieure à 3,5 kDa. Il est à noter que le volume gastrique de ce volontaire est également rapidement diminué, l'estomac étant vide à 75 minutes. Ceci suggère néanmoins que dès 75 minutes, seuls des peptides de faible masse moléculaire passent dans l'intestin de ce volontaire. Il est également envisageable, pour ce volontaire, un passage rapide du contenu gastrique, notamment des protéines plus ou moins dégradées à 30 minutes de digestion, dans l'intestin. Sur les profils 2 (H) et 5 (K), nous observons une atténuation rapide, dès 15 minutes de la bande correspondant à la caséine tandis que la blg est toujours présente après 75 ou 90 minutes de digestion selon le volontaire considéré. A 105-120 minutes, hormis la bande protéique à 35 kDa, les autres entités protéiques sont totalement dégradées en peptides de masse moléculaire inférieure à 6 kDa, suggérant donc le passage dans l'intestin d'entité de 35 kDa et de peptides de faible masse moléculaire. Une bande intrigante de 55 kDa apparaissant à 45 minutes est mise en évidence pour le profil 5 (K) tandis qu'elle n'apparaît pas pour le profil 2 (H). Du fait de l'existence de cette bande, nous avons choisi de retenir cet échantillon pour les études d'immunoréactivité.

Nous avons donc étudié l'effet de la digestion gastrique sur l'immunoréactivité associée à la caséine entière et à la blg. L'analyse est effectuée par test ELISA par compétition à l'aide de

deux sérums de patients allergiques à l'arachide en prenant pour compétiteurs, les prélèvements correspondant aux temps de digestion : 0, 15, 45 min et le dernier temps de prélèvement disponible, à savoir, 60, 105 et 120 min respectivement pour les volontaires 1 (G), 2 (H) et 5 (K).

A titre d'exemple, nous avons représenté les courbes d'inhibition de la liaison de la caséine entière aux IgE du patient allergique M35 par les différents digesta obtenus à partir du profil 1(G) (figure 59).

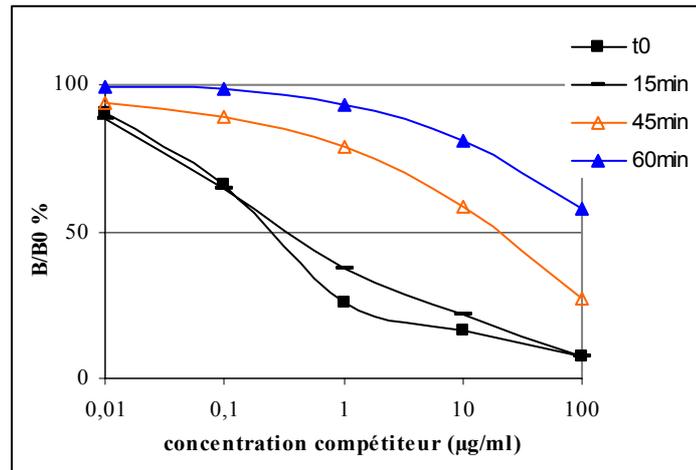


Figure 59 : courbes d'inhibition de la liaison de la caséine entière immobilisée aux IgE spécifiques du sérum M35 d'un patient allergique au lait par des doses croissantes de digesta gastrique (à 0, 15, 45 et 60 min) du volontaire 1 (G).

La comparaison des digesta gastriques du volontaire 1 montre que la concentration nécessaire pour inhiber 50% de la liaison de la caséine entière aux IgE spécifiques (IC50) augmente significativement au cours de la digestion. Ainsi, l'immunoréactivité de la caséine entière du lait diminue au cours de la digestion, d'un facteur 65 dès 45 minutes de digestion.

A l'aide des différentes courbes d'inhibition, obtenues pour les deux sérums M30 et M35, nous avons calculé les valeurs d'IC50 pour les différents échantillons. Ces valeurs sont répertoriées dans le tableau 32.

**Tableau 32 : concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison de la caséine entière ou de la blg aux IgE spécifiques par des doses croissantes de digesta *in vivo* de lait obtenu chez des volontaires sains. Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .**

		IC50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )			
		Caséine entière		blg	
		M30	M35	M30	M35
Profil 1 (G)	G1 (t0)	0,08	0,24	0,3	1
	G2 (t15)	0,3	0,5	1,1	1,3
	G4 (t45)	12	16	8	17
	G5 (t60)	7	>100	27	50
Profil 2 (H)	H1 (t0)	0,04	0,2	0,5	2,5
	H2 (t15)	40	>100	>100	>100
	H4 (t45)	38	>100	>100	>100
	H8 (t105)	50	>100	>100	>100
Profil 5 (K)	K1 (t0)	0,2	0,2	0,7	1,7
	K2 (t15)	58	>100	13	>100
	K4 (t45)	45	>100	20	>100
	K9 (t120)	>100	>100	97	>100

Pour chaque profil, il a été préparé une solution de digestion. Le temps  $t=0$  pour chaque profil correspond à la solution de digestion avant l'ingestion par le volontaire. L'immunoréactivité liée à la caséine entière et à la blg au temps  $t=0$  peut légèrement varier pour un même sérum, ce qui résulterait d'une différence dans la concentration protéique de la solution à ingérer.

En dépit de ces variations d'IC50 entre les temps  $t=0$  des trois profils, nous pouvons observer une convergence de résultats. Pour chaque profil choisi et chaque sérum utilisé, la digestion entraîne une augmentation de l'IC50. Quelque soit le sérum analysé, le profil 1 (G) se distingue des profils 2 (H) et 5 (K) par des concentrations de 50% d'inhibition de la liaison IgE-caséine ou IgE-blg plus faibles. Le profil 1 (G) perd progressivement sa capacité d'inhibition de la liaison des IgE à la blg avec notamment des IC50 à 15 minutes de digestion (G2) proches de ceux obtenus à  $t=0$  minute (G1). A partir du prélèvement à 45 minutes, les valeurs d'IC50 deviennent fortes.

Par contre, les deux profils de dégradation 2 (H) et 5 (K) sont à l'origine de l'augmentation brutale des IC50 dès le prélèvement à 15 minutes. A titre d'exemple, la concentration du prélèvement H2 ( $t=15$  min) nécessaire pour inhiber la liaison des IgE à la caséine entière est toujours supérieure d'un facteur 500 à celle du prélèvement H1 ( $t=0$  min). Pour des prélèvements plus tardifs, au-delà de 15 minutes, la valeur déjà élevée des IC50 est maintenue voire augmentée. Pour le sérum M30, le profil 5(K) apparaît légèrement différent du profil 2 (H) avec une inhibition plus importante de la liaison des IgE à la blg, au même temps de digestion. Ces observations sont reproduites autant pour l'immunoréactivité liée à la blg que celle associée à la caséine entière.

Les dégradations des protéines observées en électrophorèse pour les trois profils apparaissent associées avec une perte d'immunoréactivité de ces digesta. Pour le profil 1 (G) qui présente des bandes résiduelles de blg et caséine entière après 15 minutes de dégradation, la baisse d'immunoréactivité est plus progressive que celle démontrée pour les profils 2 (H) et 5 (K). Cette influence de la dégradation sur l'immunoréactivité est valable autant pour la blg que pour la caséine entière. Par contre, le profil 1 (G), qui présente une dégradation apparemment complète de la blg et de la caséine entière après 60 minutes de digestion, préserve une immunoréactivité significative. L'existence de produits de dégradation capables d'être reconnus par les IgE pourrait expliquer cette immunoréactivité résiduelle. Des changements structuraux plus discrets que des dégradations pourraient être à l'origine de ces modifications de la reconnaissance par les IgE.

Il est à noter que la bande intrigante dans le profil de digestion *in vivo* ne semble pas avoir d'influence sur l'immunoréactivité de la blg et des caséines.

### **c) Conclusion**

Comme pour l'arachide, nous avons étudié l'effet de la digestion gastro-duodénale *in vitro* et celui de la digestion gastrique *in vivo*. Les profils de digestion *in vivo* obtenus pour le lait varient en fonction du volontaire considéré et il semble donc très difficile de simuler une digestion gastrique par un simple modèle *in vitro*. Ces hétérogénéités pourraient avoir différentes explications caractéristiques des protéines et de la matrice alimentaire : efficacité des enzymes gastriques par rapport à la quantité de protéines à digérer, pH de l'estomac, volume de l'estomac, état physiologique, association micellaire des caséines...

La comparaison effectuée entre le modèle de digestion *in vitro* et le mécanisme physiologique *in vivo* montre que l'effet sur l'immunoréactivité de la digestion gastrique *in vitro* mime seulement un des profils gastriques *in vivo* et ne peut donc pas « être généralisable ».

Toutefois, les résultats des études *in vivo* corroborent ceux des simulations gastriques et duodénales *in vitro*. Les analyses sur le yaourt résument bien la disparition de l'immunoréactivité consécutive à l'hydrolyse et à l'obtention de fragments protéiques.

La digestion gastrique *in vivo* du lait génère des fragments peptidiques faiblement reconnus par les IgE de patients allergiques au lait que nous avons testé. Les digestions ont été réalisées sur des patients sains, pour lesquels le processus de digestion gastrique fonctionne

normalement. Ce processus physiologique conduit à la formation de fragments peptidiques dont le potentiel immunoréactif, et a fortiori le potentiel sensibilisant, est affaibli. Or, pour les patients sensibilisés aux allergènes du lait de vache, la sensibilisation a pu avoir lieu lors d'un contexte physiologique défavorable, affaiblissant le processus digestif et la barrière intestinale. Ces états pathologiques peuvent favoriser ainsi l'exposition au système immunitaire d'épitopes non hydrolysés, voire d'infime quantité d'allergène entier. Lors de l'étude de l'immunoréactivité des digesta, nous nous sommes attachés uniquement à la blg et aux caséines, allergènes majeurs du lait de vache. Il faut noter que même si l'immunoréactivité de la blg et/ou des caséines est abolie, d'autres allergènes peuvent rester immunoréactifs, ce qui pourrait être illustré par la bande à 35 kDa sur les profils 2 (H) et 5 (K) qui persiste au cours de la digestion. Nous ne cherchons pas à réduire l'allergénicité du lait de vache aux seuls allergènes blg et caséines, mais ce sont des modèles intéressants pour ces études.

La différence d'immunoréactivité entre le lait et le yaourt laisse envisager que certains épitopes du lait sont dénaturés ou dégradés au cours de la fermentation lactique du fait des conditions de pH, de température, des bactéries lactiques. Nous pouvons entrevoir que certains patients, allergiques au lait de vache, présentent une spécificité contre les épitopes dégradés lors de la fermentation lactique pour la production de yaourt.

Il reste à envisager de réaliser les analyses d'immunoréactivité à l'aide de plus de sérums, 2 ou 3 sérums ne permettant pas d'affirmer une tendance générale ou de tirer des conclusions exhaustives. Les techniques d'analyses de l'immunoréactivité des digesta pourraient être complétées par des immuno-empreintes qui permettraient par exemple de mettre en évidence des fragments de blg et/ou de caséines ainsi que d'autres allergènes impliqués dans l'immunoréactivité du lait et du yaourt. Ces études pourraient nous aider à confirmer certaines de nos hypothèses. Ces perspectives ne sont pas exhaustives et laissent entrevoir la multitude de travaux pertinents qu'ils restent à réaliser afin d'améliorer l'analyse de la digestion du lait et du yaourt.

Lors des deux processus de digestion *in vitro* et *in vivo*, les hydrolyses protéiques conduisent à la production de fragments peptidiques associée à une perte d'immunoréactivité des allergènes majeurs du lait. Ce phénomène n'est pas observé lors de l'analyse de la l'hydrolyse digestive de l'arachide qui, au contraire, génère des fragments peptidiques tout aussi immunoréactifs que les protéines natives.

## IV. Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons abordé deux points clé de l'allergie alimentaire : l'évolution de l'immunoréactivité à la suite des procédés thermiques pratiqués en industrie et dans tous les foyers, mais également à la suite des processus naturels de digestions gastrique et intestinale.

Le premier point, l'effet des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide, permet de décrire une diminution significative de l'immunoréactivité lorsque les arachides sont bouillies. Cette diminution n'est pas forcément associée à des modifications structurales des protéines, mais plutôt à une perte des allergènes de faible masse moléculaire qui sont retrouvés dans l'eau de cuisson. Ce phénomène semble corrélé avec la faible prévalence de l'allergie à l'arachide dans les pays tels que la Chine où les arachides sont cuites de cette manière. Le chauffage humide pourrait donc être utilisé dans les industries alimentaires pour réduire l'allergénicité des fractions protéiques de l'arachide utilisées pour la préparation de différents aliments. Mais, il est possible que par ce procédé, certaines propriétés de l'arachide (agents texturants par exemple), qui intéressent fortement les industriels, soient perdues. Il est également très probable que la perte de l'allergénicité des arachides entières par voie technologique ou agronomique ne soit que partielle et demeure ainsi une solution insuffisante pour la gestion et la prévention du risque alimentaire, du fait de la multitude des allergènes impliqués. Nous sommes loin de produire une arachide « hypoallergénique » comme l'évoquait Bannon et *al.* (1999). Nos résultats soulignent l'importance de l'étiquetage des produits alimentaires lorsque les aliments allergéniques connus tels que l'arachide sont utilisés dans la chaîne de production industrielle.

Le deuxième point, l'effet de la digestion gastrique et de la digestion duodénale sur l'immunoréactivité de deux aliments, le lait et l'arachide, apporte des éléments majeurs dans le domaine de l'allergie alimentaire. Pour ces études, nous avons bénéficié de modèles *in vitro* développé par l'IFR de Norwich, et confirmé ces derniers par une analyse de digesta gastriques *in vivo* également préparés par l'IFR de Norwich. La résistance à la digestion, et particulièrement à la digestion par la pepsine, est encore considérée comme une caractéristique importante mais non indispensable pour l'évaluation de l'allergénicité d'une protéine nouvelle (Aalberse, 1997). L'effet de la digestion sur un allergène donné purifié peut

être différent de celui sur ce même allergène au sein de la matrice alimentaire. Il est donc important de considérer l'allergène isolé mais également et surtout dans l'aliment entier où les interactions avec d'autres protéines ou autres composés (notamment les lipides) peuvent avoir lieu et interférer sur la digestion enzymatique (Maleki *et al.*, 2003) et l'immunoréactivité. Nos résultats suggèrent que les conditions de digestion *in vitro* sur un allergène isolé ne peuvent pas prédire la stabilité de la protéine *in vivo* ; elles restent toutefois utiles pour l'identification de régions de la protéine qui sont plus résistantes à la protéolyse que d'autres fractions d'allergènes ou d'autres protéines non allergéniques. Il est important d'inclure plusieurs méthodes d'analyse pour l'évaluation du potentiel allergénique d'une nouvelle protéine. Il est également intéressant de noter que nous avons observé des différences dans l'évolution de l'immunoréactivité au cours du processus physiologique de digestion entre l'arachide et le lait. Pour les deux modèles, les allergènes sont sensibles à l'hydrolyse par les enzymes digestives, la pepsine pour la digestion gastrique, et la trypsine et la chymotrypsine pour la digestion duodénale. Pour les allergènes majeurs du lait de vache, la dégradation est plus ou moins rapide au cours de la digestion et cette dégradation est accompagnée d'une diminution de l'immunoréactivité. Les épitopes de ces allergènes semblent affectés par ces hydrolyses enzymatiques. Par contre, pour les allergènes de l'arachide, malgré une dégradation rapide des allergènes de masse moléculaire élevée suivie de celle des allergènes de plus faible masse moléculaire, l'immunoréactivité persiste et reste pratiquement aussi importante après le processus de digestion. Ces résultats sont confortés par les tests de dégranulation des basophiles qui montrent une capacité de stimulation de la libération d'histamine non diminuée à la suite du processus complet de digestion gastro-duodénale d'Ara h 1. Cette différence de l'évolution de l'immunoréactivité au cours de la digestion entre l'arachide et le lait peut être rapprochée des caractéristiques propres à ces deux allergies. L'allergie au lait présente une rémission de 80% (Kajosaari, 1982) lorsque les patients atteignent l'âge de 4 ans tandis que celle de l'allergie à l'arachide n'est que de 20% (Skolnick *et al.*, 2001). Les manifestations cliniques sont sévères parfois très graves pour l'allergie à l'arachide, tandis qu'elles restent relativement modérées pour l'allergie au lait de vache. Les patients sensibilisés à l'arachide, malgré un processus physiologique de digestion « normal » sont exposés à des épitopes fortement reconnus par les IgE alors que les IgE des patients sensibilisés au lait de vache rencontrent après la digestion gastrique « normale » beaucoup moins de fragments immunoréactifs. Cette observation pourrait constituer une hypothèse de travail dans l'étude

des paramètres expliquant la différence de sévérité clinique et de rémission entre les allergies à l'arachide et au lait de vache.

L'éviction de l'arachide apparaît être la seule et meilleure prévention pour les patients allergiques à l'arachide alors que des produits issus de dégradations enzymatiques intensives peuvent être utilisés comme palliatif dans l'alimentation des allergiques au lait.

La richesse des analyses de cette troisième partie portant sur l'effet des procédés technologiques et de la digestion gastro-duodénale sur l'immunoréactivité de l'arachide et du lait repose sur la collaboration de différents partenaires européens, aux compétences multiples. Ce programme a permis de réaliser des études plus complexes à l'aide de réactifs que nous n'avions pas à disposition (sérums, digesta,...). Tous les résultats obtenus sont soumis ou en préparation de publications.

Les différentes analyses réalisées nous ont permis de souligner la complexité de l'allergie à l'arachide. La caractérisation de la réponse IgE met en évidence l'implication de trois familles protéiques, les albumines 2S, les globulines 7S et 11S. Les différents allergènes purifiés n'apparaissent pas spécifiques d'un patient donné ou même d'un groupe de clinique de patients.

Ce phénomène généralisé de polysensibilisation est retrouvé lors de la détermination d'épitopes où nous avons pu observer l'implication simultanée de différentes régions d'Ara h 2 et/ou des isoformes d'Ara h 3 dans la réponse IgE.

Enfin, la sévérité de l'allergie à l'arachide peut être évoquée par les résultats des tests *in vivo*, autant en terme de réactivité cutanée forte des albumines 2S qu'en terme de reconnaissance IgE conservée malgré des dégradations digestives importantes des allergènes.

Chacun de ces points suscite de nouvelles interrogations, et ouvre donc la voie à des études futures.

### **Recherche d'une corrélation entre réponse immunitaire et état allergique du patient**

L'analyse de la spécificité de la réponse IgE nous a conduit à développer un outil original, EAST inversé complémentaire du test par immobilisation de l'allergène. Ce nouvel outil de caractérisation de la réponse IgE, à la fois plus sensible et plus spécifique, pourrait contribuer à l'amélioration du diagnostic de l'allergie à l'arachide. Son utilisation pourrait être généralisée à d'autres allergies, alimentaires ou polliniques.

Par ailleurs, son application à l'analyse de la réponse IgG spécifique permettrait d'attribuer aux sous-classes, notamment IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>4</sub>, un rôle dans l'évolution de l'allergie, rôle qui n'a pas pu être défini avec nos techniques classiques.

Dans ce cadre, nous pourrions envisager d'établir un lien entre l'évolution clinique de l'allergie du patient et le profil de réponse IgE et IgG. Cette spécificité nécessiterait une étude approfondie avec un suivi longitudinal des patients : âge de la première sensibilisation, évolution de la symptomatologie, acquisition ou non d'une tolérance. Il serait intéressant d'établir une corrélation de l'évolution de la maladie au cours de la vie du patient avec tous les allergènes sélectionnés et également avec les épitopes de ces mêmes allergènes.

Cette évocation d'épitopes permet également de suggérer de nouvelles recherches.

## **Approfondissement de la caractérisation des épitopes des albumines 2S et des globulines 11S**

L'hydrolyse enzymatique des albumines 2S et des globulines 11S nous a conduit à l'identification des régions préférentiellement reconnues par les IgE.

Poursuivre l'hydrolyse de ces fragments à l'aide d'enzymes telles que la pepsine, la chymotrypsine... permettrait d'affiner l'identification des épitopes. De plus, il serait intéressant d'approfondir le rôle des modifications structurales et notamment de l'hydroxylation des prolines dans l'immunoréactivité des allergènes de l'arachide. En effet, Petersen *et al.* (1998) ont montré que pour l'allergène majeur du pollen de l'herbe verte, Ph1 p 1, l'hydroxylation des prolines augmentent la réactivité IgE contre cet allergène. Une étude comparative de fragments synthétiques contenant ou non les prolines hydroxylées pourrait confirmer le rôle d'une telle modification post-traductionnelle dans la reconnaissance par les IgE de patients allergiques à l'arachide.

Enfin, la recherche d'épitopes pour Ara h 6 est envisagée en conservant l'intégrité de la molécule. La méthode suggérée est appelée « présentation épitopique ». Cette approche nécessite l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-Ara h 6, récemment disponibles au laboratoire. La connaissance de leur spécificité est actuellement en cours. L'allergène Ara h 6 serait présenté aux IgE de patients allergiques à l'arachide par les MAb de spécificité connue. Pour chaque sérum, les intensités de réponse IgE seraient ainsi déterminées à la suite de la présentation d'Ara h 6 par les différents MAb. Puis, la comparaison de ces différentes intensités permettrait de déterminer l'importance des différents épitopes, précédemment caractérisés, dans l'immunoréactivité de l'allergène Ara h 6.

L'ensemble de ces études permettrait d'incriminer des épitopes communs aux albumines 2S de l'arachide et également des épitopes communs aux globulines 11S de différentes légumineuses.

La caractérisation fine des épitopes permettrait de suivre leur devenir lors de processus complexes de dégradations.

## **Analyse des peptides impliqués dans l'immunoréactivité des digesta gastriques et intestinaux de l'arachide**

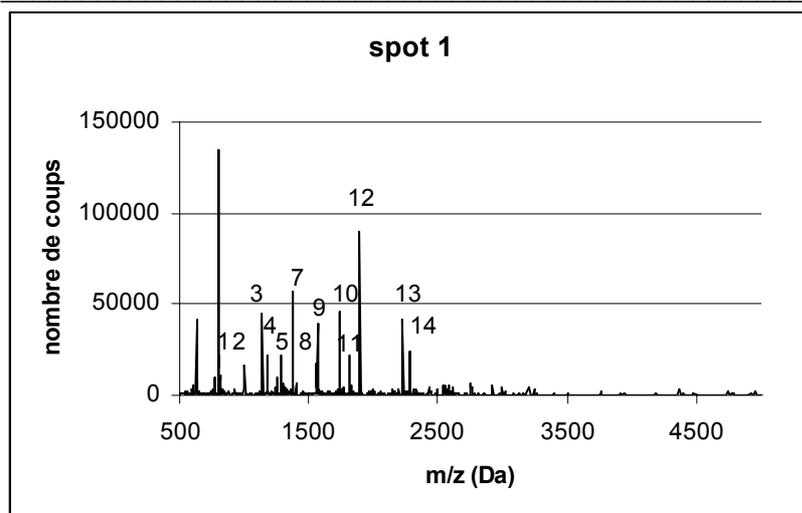
En effet, lors de la digestion gastrique et de la digestion intestinale, réalisées *in vitro* et *in vivo*, les extraits d'arachide brute et également l'allergène purifié Ara h 1 conservaient

pratiquement l'intégralité de leur immunoréactivité. Il reste à caractériser les fragments peptidiques impliqués dans cette reconnaissance par les IgE en les isolant par des techniques biochimiques qui conservent les éventuelles agrégations formées entre certains fragments peptidiques. Des travaux récents ont décrit la capacité des peptides à former des agrégats possédant des fonctions biologiques relevantes (Nichols et *al.*, 2005). La disparition des peptides de faible masse moléculaire sur les gels électrophorétiques pourrait s'expliquer par la formation d'agrégats qui auraient la même capacité de lier les IgE de patients allergiques à l'arachide que la protéine originelle. Un article original, portant sur l'analyse du potentiel allergénique des produits issus de la digestion gastro-intestinale d'Ara h 1, a été réalisé avec les différents partenaires du programme européen et soumis au *Journal of Clinical Investigation*. Il présente un mécanisme nouveau de préservation des propriétés allergéniques et immunogéniques d'Ara h 1. Bien qu'Ara h 1 soit dégradé par la digestion en peptides de faible masse moléculaire, il conserve les propriétés allergéniques de la protéine intacte. Il est également établi que l'agrégation des fragments de faible masse moléculaire pour former des complexes de masse moléculaire plus élevée est responsable de ce phénomène. Il reste à montrer si ce mécanisme est opérationnel pour les allergènes de l'arachide au sein de la matrice alimentaire mais également pour d'autres allergènes alimentaires.

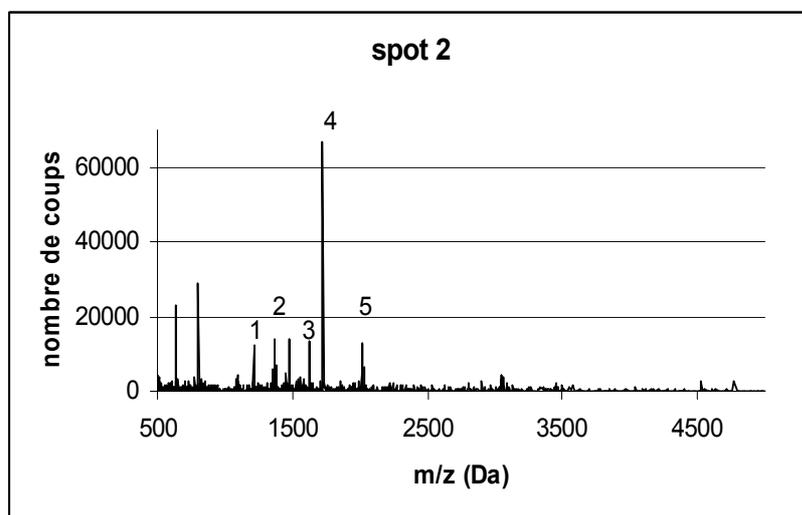
Loin de la reconnaissance de peptides synthétiques par les IgE de patients, nous aurions un aperçu plus réel des épitopes des allergènes de l'arachide conservés après les processus de digestion humaine.

Nous sommes conscients que l'ensemble des projets décrits dans ces perspectives représente une somme de travail considérable. Il nous appartiendra de choisir parmi les différents sujets les approches à privilégier. Cependant, il nous paraissait intéressant d'exposer l'ensemble de ces perspectives pour montrer les différents aspects de l'étude de l'allergie à l'arachide que le travail effectué a permis d'aborder.

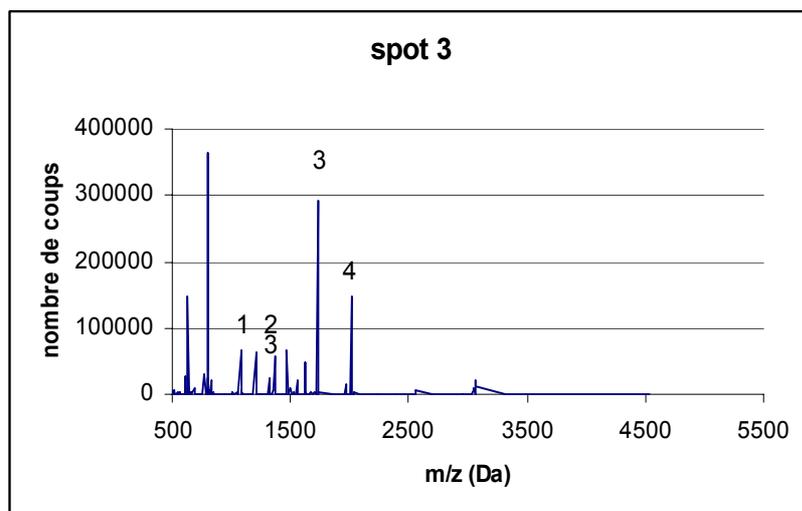
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	811,022	109	115
2	1004,109	132	139
3	1140,035	166	174
4	1183,104	199	207
5	1257,072	249	259
6	1286,914	302	312
7	1378,138	260	271
8	1558,852	147	160
9	1570,824	329	342
10	1736,835	313	327
11	1816,045	536	551
12	1893,029	313	328
13	2225,057	282	301
14	2279,659	473	490

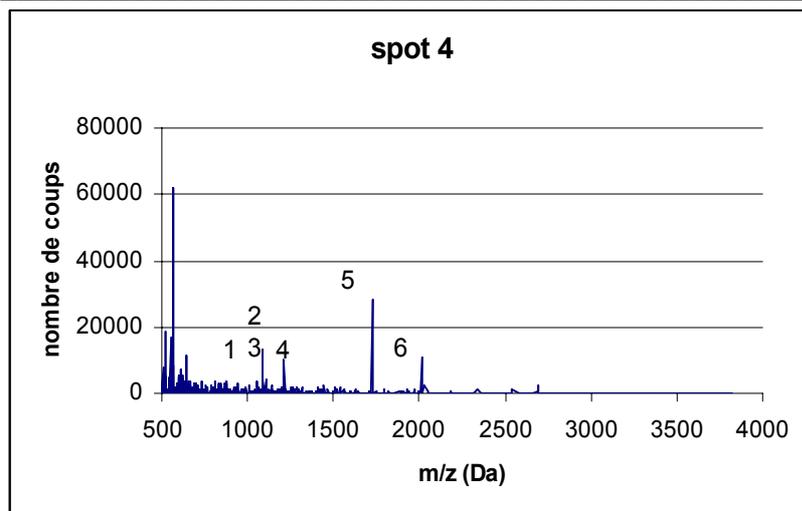


	m/z (Da)	début	fin
1	1211,374	90	100
2	1351,448	80	90
2	1351,448	79	89
3	1623,633	38	50
4	1725,368	101	113
5	2011,754	114	129

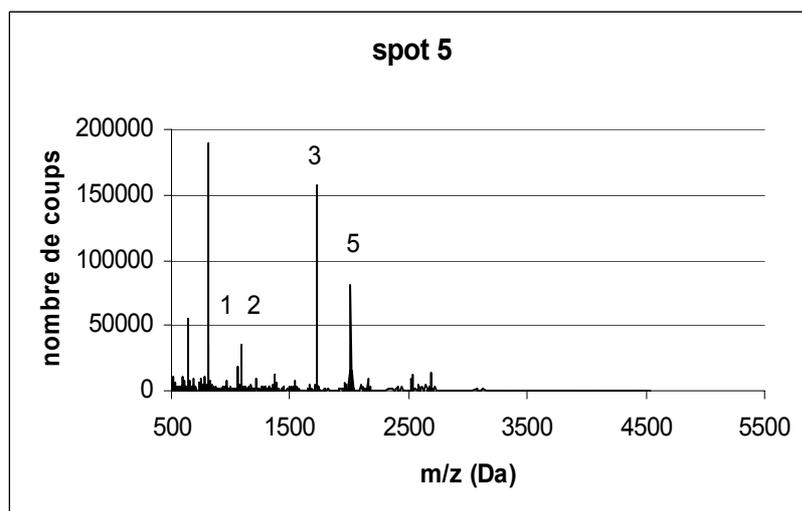


	m/z (Da)	début	fin
1	1084,439	135	143
2	1211,354	80	90
3	1314,46	23	32
4	1623,527	40	52
5	2011,58	104	119

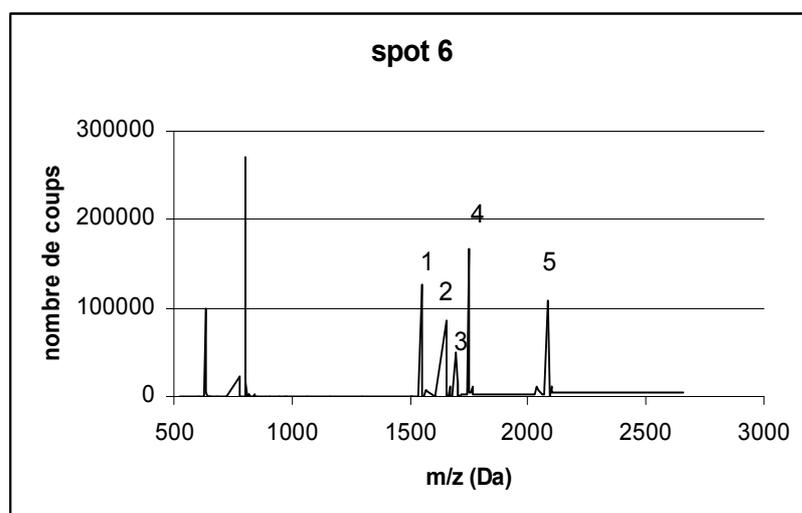
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	1055,2352	81	90
2	1084,272	135	143
3	1090,222	124	131
4	1211,272	80	90
5	1725,072	91	103
6	2011,312	104	119

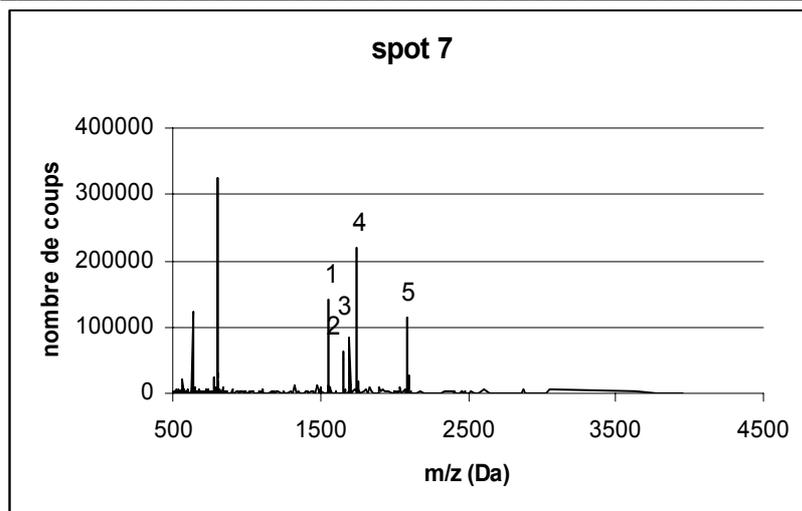


	m/z (Da)	début	fin
1	1055,022	81	90
2	1084,104	135	143
3	1724,827	91	103
4	2011,069	104	119

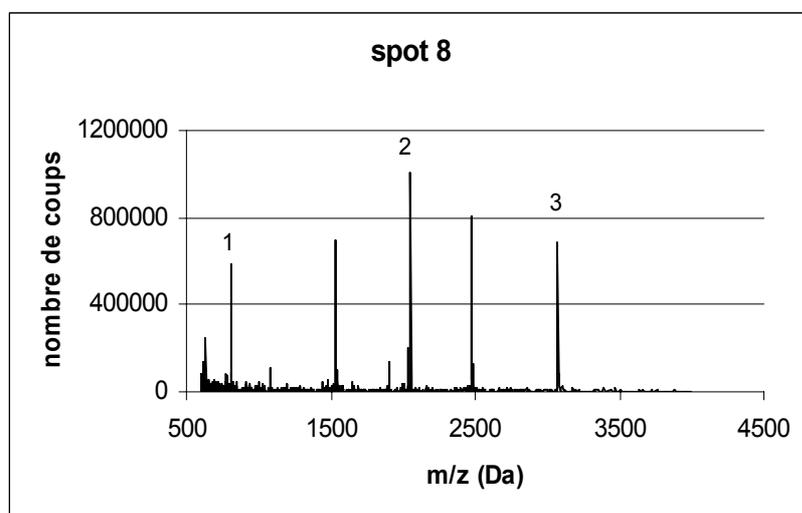


	m/z (Da)	début	fin
1	1548,454	119	130
2	1651,465	41	53
3	1698,147	78	90
4	1745,316	54	67
5	2084,427	91	106

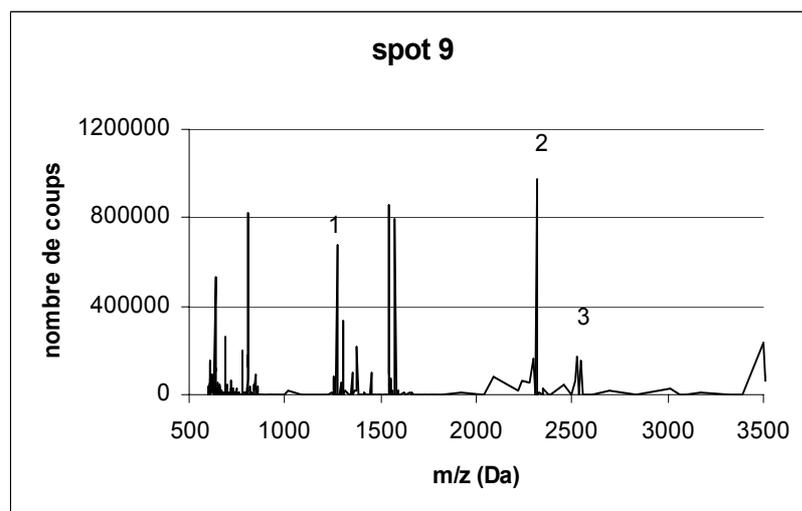
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	1548,375	119	130
2	1651,411	41	53
3	1698,085	78	90
4	1745,32	54	67
5	2084,36	91	106

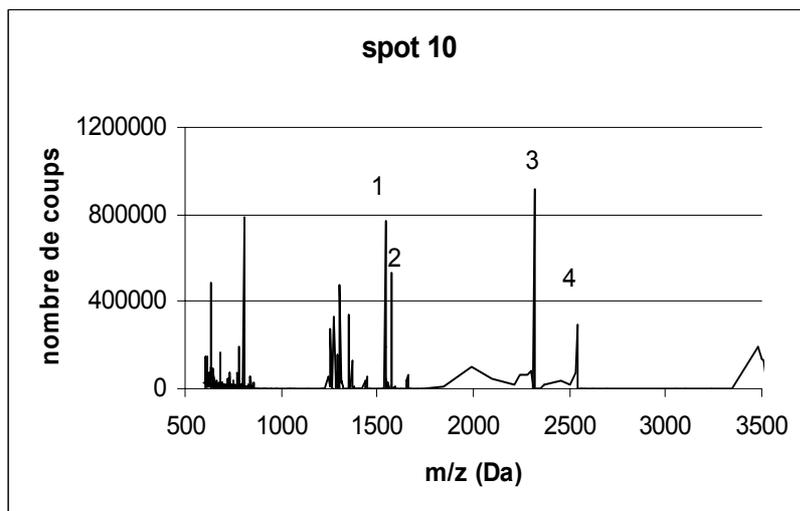


	m/z (Da)	début	fin
1	870,9068	280	301
2	2050,9816	423	434
3	3070,008	388	420

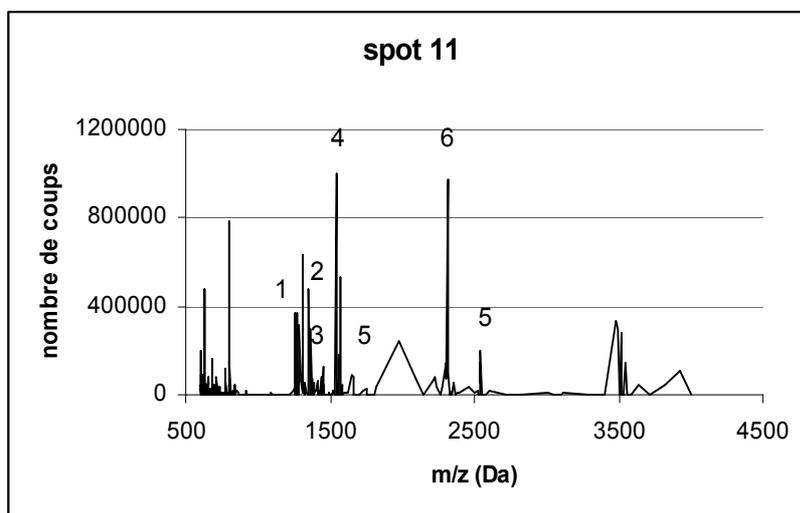


	m/z (Da)	début	fin
1	1449,2494	459	470
2	2314,8232	402	421
3	2541,8547	436	458

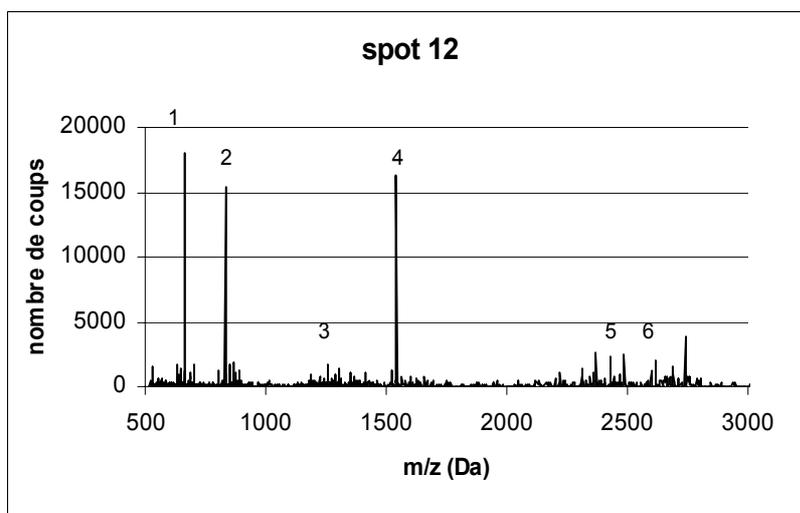
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	1546,4625	516	529
2	1574,4812	198	210
3	2314,9412	401	420
4	2542,0755	435	457

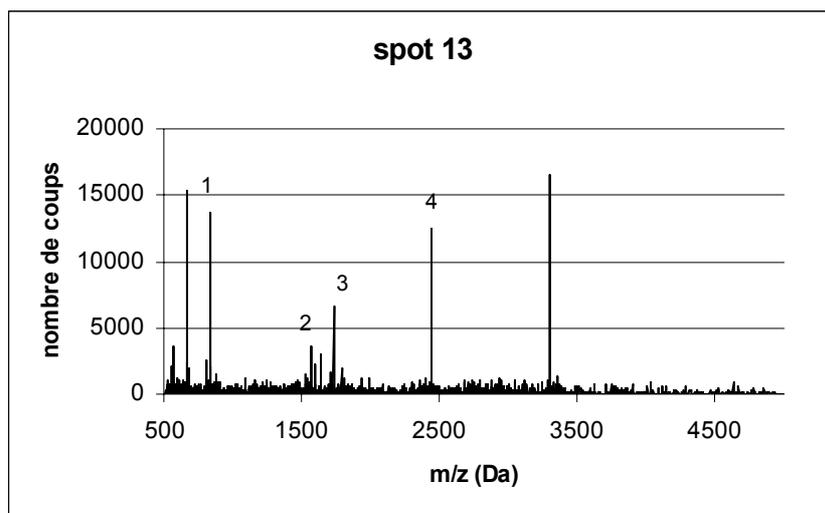


	m/z (Da)	début	fin
1	1256,1527	377	387
2	1390,1512	364	376
3	1435,0739	458	469
4	1542,1265	388	400
5	1660,2712	362	376
6	2314,3772	401	420
7	2541,5408	435	457

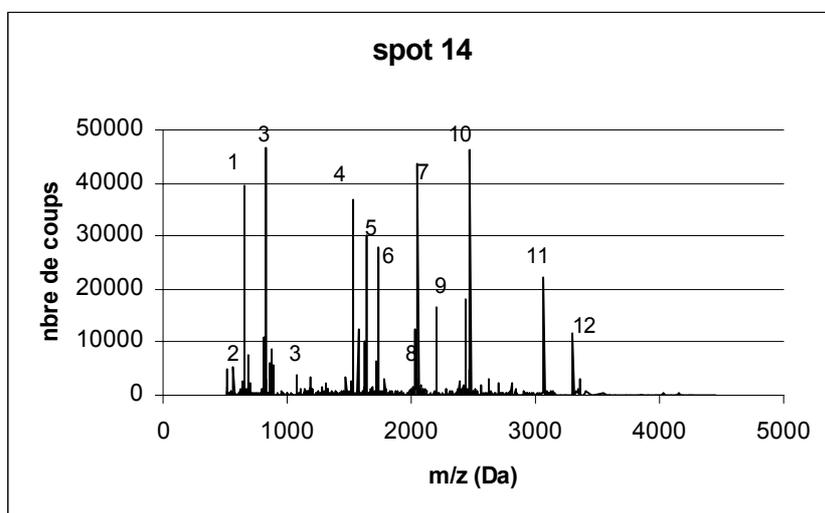


	m/z (Da)	début	fin
1	700,1039	306	311
2	870,0871	280	286
3	1255,4904	377	387
4	1541,4958	388	400
5	2427,9231	280	300
6	2688,0093	314 ou 313	334 ou 333

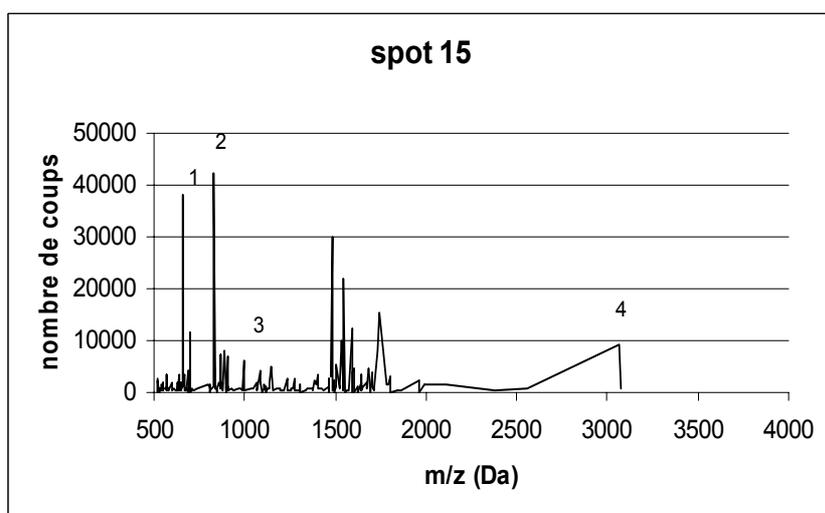
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	809,5044	211	216
2	1574,9933	198	210
3	1731,1156	197	210
4	2441,6384	280	301

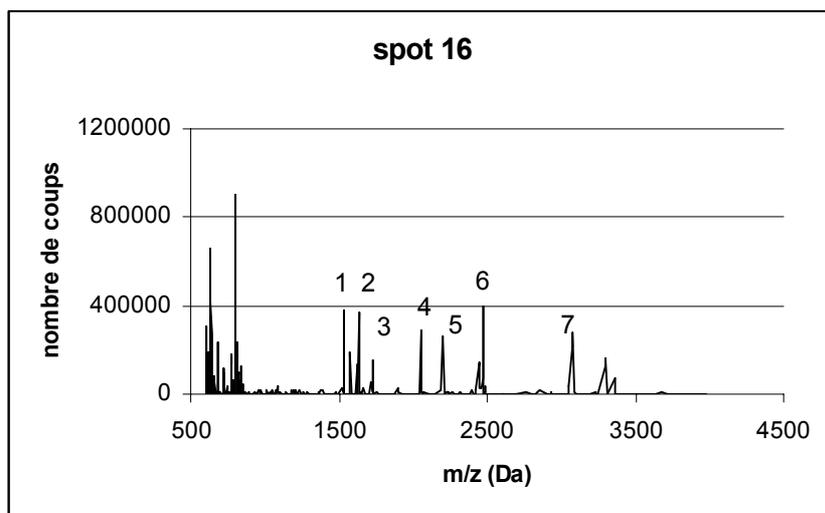


	m/z (Da)	début	fin
1	656,599	74	78
2	809,5314	211	216
3	870,3855	280	286
4	1083,7281	302	311
5	1574,9695	198	210
6	1731,0833	197	210
7	2051,3022	83	99
8	2203,245	131	148
9	2442,564	280	301
10	2474,4641	100	121
11	3070,8025	47	73
12	3302,9778	250	279

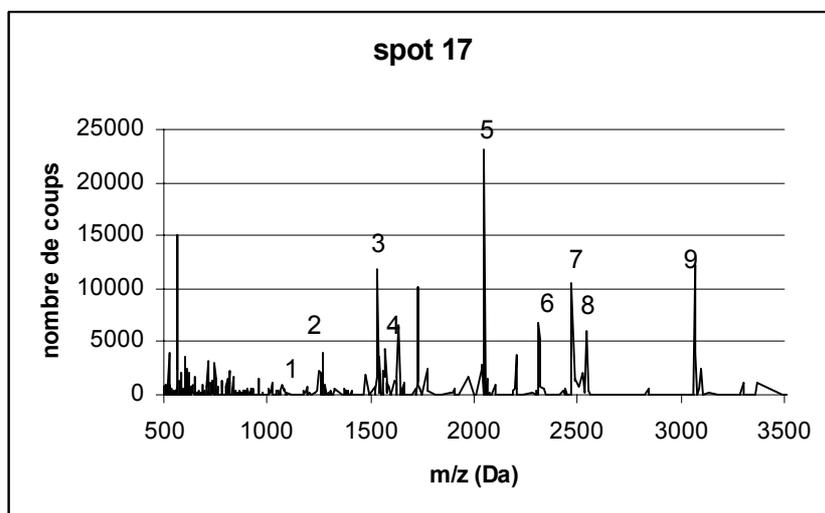


	m/z (Da)	début	fin
1	700,3652	306	311
2	870,3852	280	286
3	1083,7091	302	311
4	3069,8661	47	73

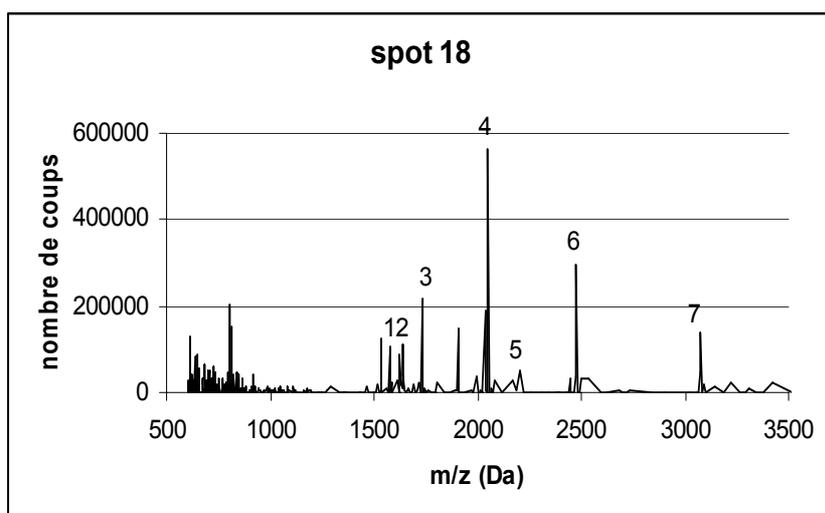
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	1535,2263	26	37
2	1575,3159	198	210
3	1731,4186	197	210
4	2051,3157	83	99
5	2203,4202	131	148
6	2474,6188	100	121
7	3070,8338	47	73

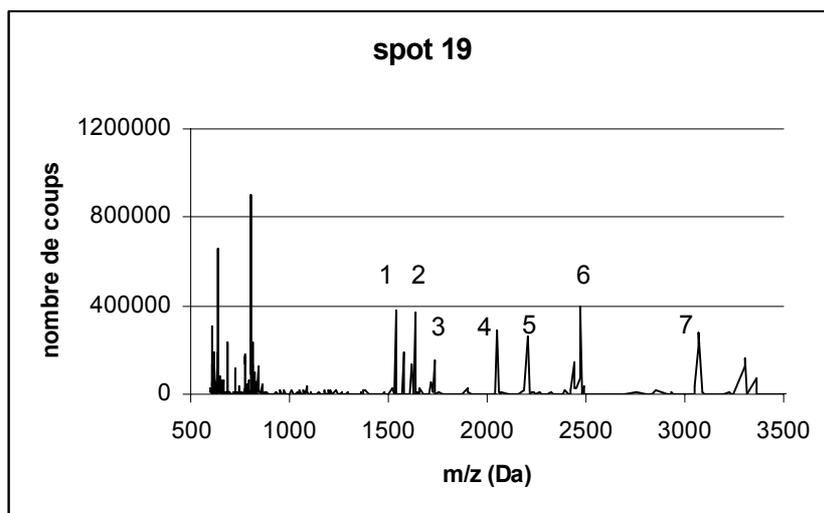


	m/z (Da)	début	fin
1	1082,071	302	311
2	1254,001	377	387
3	1532,782	26	37
4	1572,876	198	210
5	2048,918	83	99
6	2311,956	401	420
7	2471,789	100	121
8	2540,02	435	457
9	3068,621	47	73

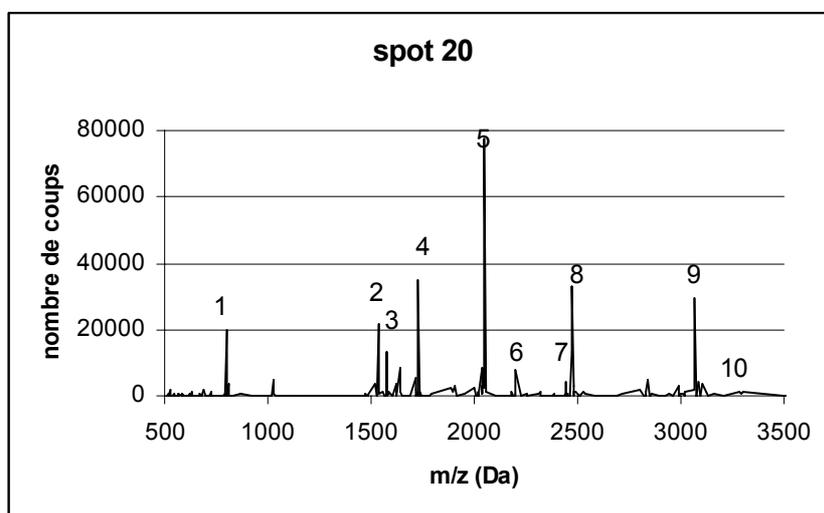


	m/z (Da)	début	fin
1	1535,0684	26	37
2	1575,1614	198	210
3	1731,2337	197	210
4	2051,0627	83	99
5	2203,2227	131	148
6	2474,3662	100	121
7	3070,4114	47	73

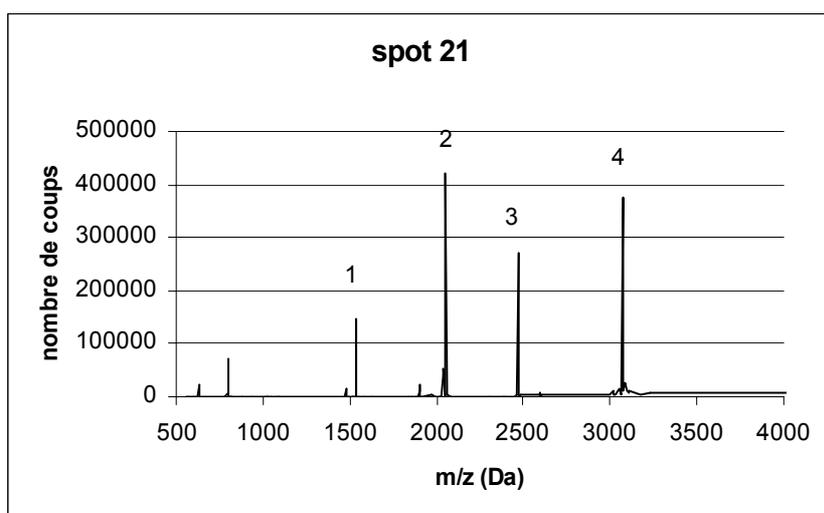
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée



	m/z (Da)	début	fin
1	1535,2263	26	37
2	1575,3159	198	210
3	1731,4186	197	210
4	2051,3157	83	99
5	2203,4202	131	148
6	2474,6188	100	121
7	3070,8338	47	73



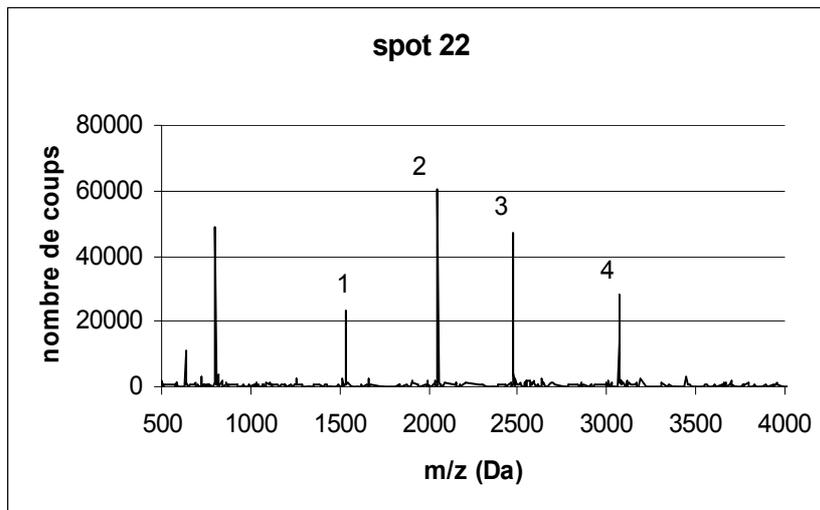
	m/z (da)	début	fin
1	808,161	211	216
2	1533,372	26	37
3	1573,466	198	210
4	1729,426	197	210
5	2049,685	83	99
6	2201,519	131	148
7	2440,709	280	301
8	2472,69	100	121
9	3068,811	47	73
10	3301,469	250	279



	m/z (Da)	début	fin
1	1533,171	26	37
2	2049,412	88	99
3	2472,385	100	121
4	3068,41	47	73

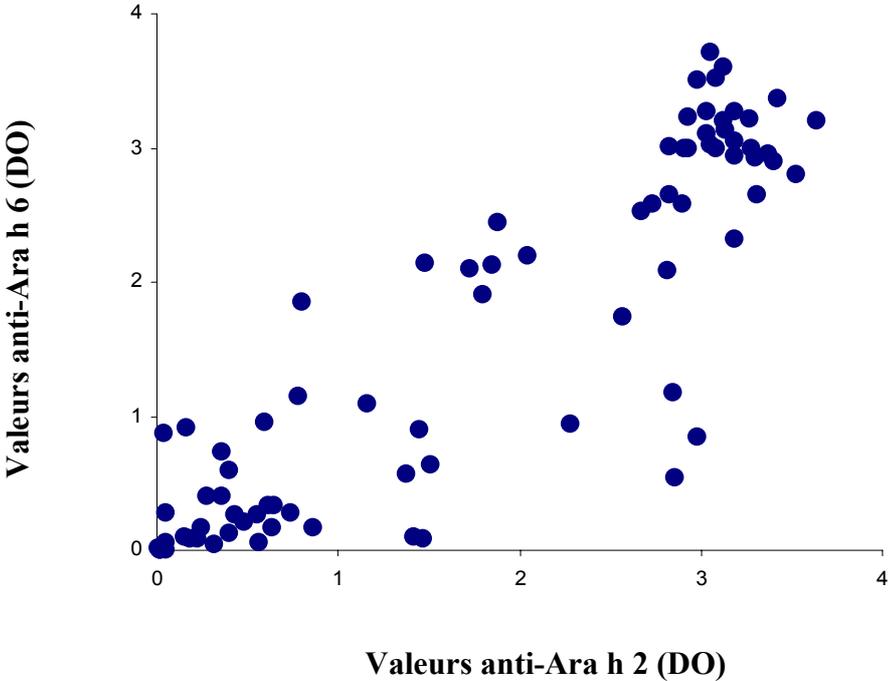
Annexe I: spectres de masse (MALDI TOF) obtenus pour les différents spots analysés sur le gel bidimensionnel de l'arachide grillée

---

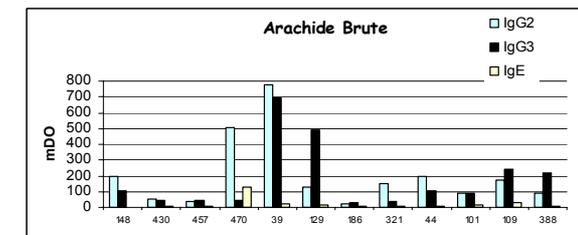
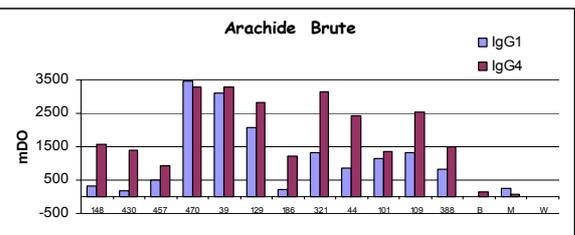
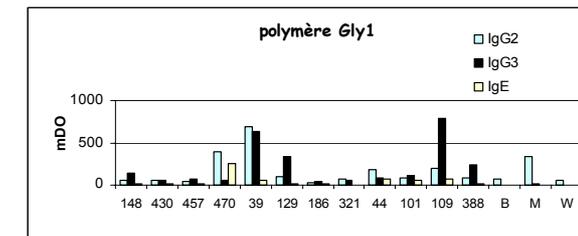
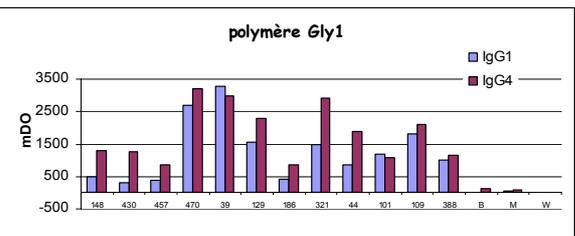
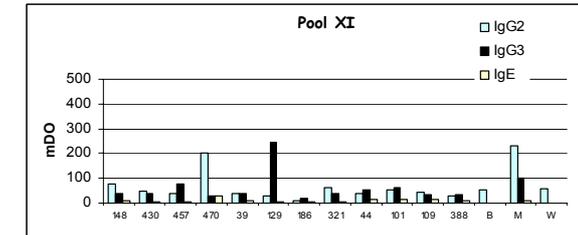
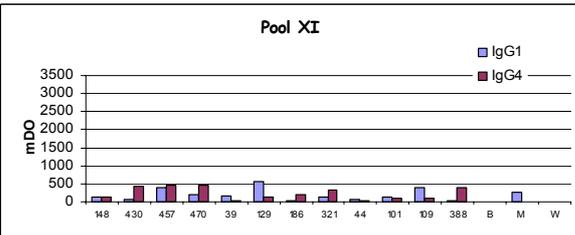
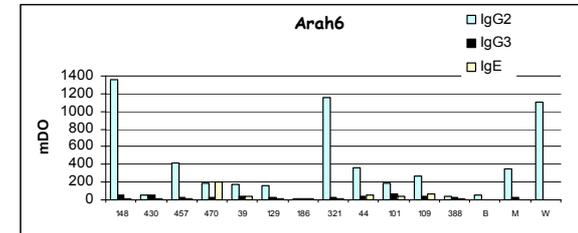
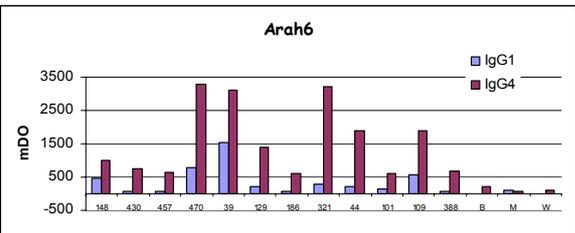
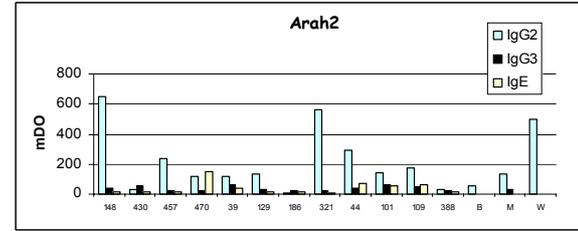
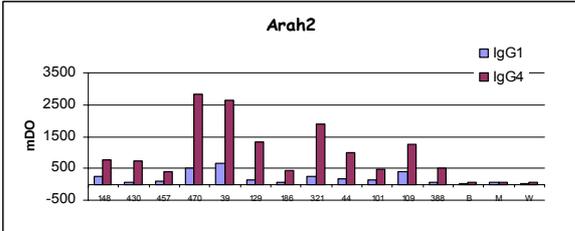
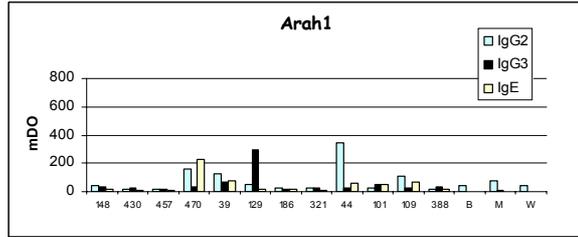
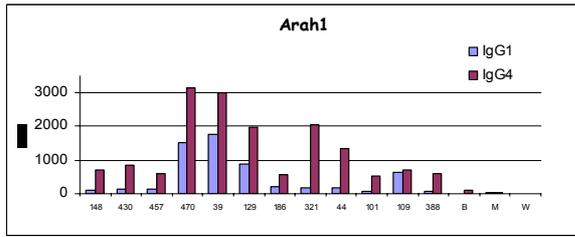


	m/z (Da)	début	fin
1	1534,1764	26	37
2	2050,2388	83	99
3	2473,1761	100	121
4	3070,2304	47	73

Remarque : les deux pics, à 634 Da et 804 Da, d'intensité importante, sont des artéfacts dues au bleu de Coomassie utilisé pour la coloration des gels.



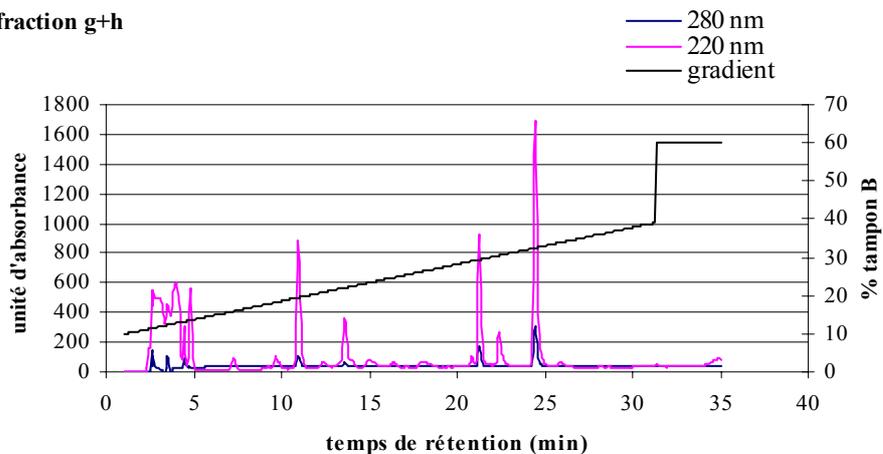
### Annexe III : représentation graphique de la réponse des sous-classes IgG par allergène



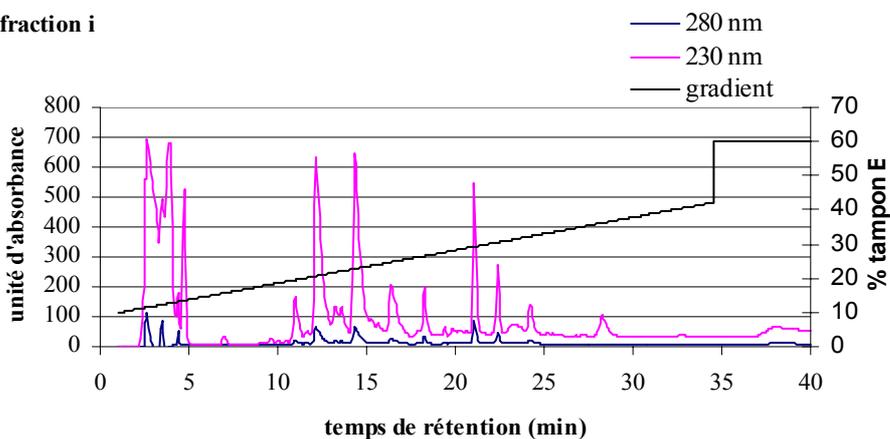
**Profil de la réponse des sous classe IgG (1,2,3,4) et des IgE contre les allergènes majeurs de l'arachide pour les différents classes cliniques des patients. Les sérums B, M, W sont des sérums d'individus non allergiques.**

Annexe IV: Chromatogrammes des purifications des fractions du premier fractionnement d'hydrolyse d'Ara h 2 sur colonne en phase inverse analytique C2/C18.

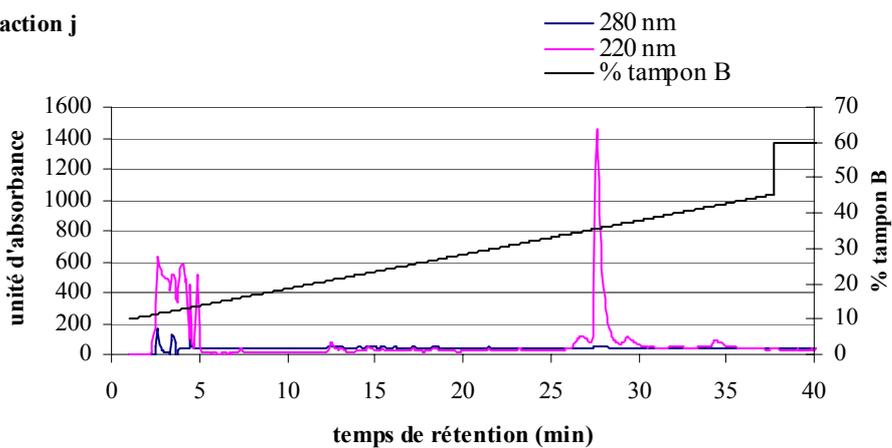
**fraction g+h**



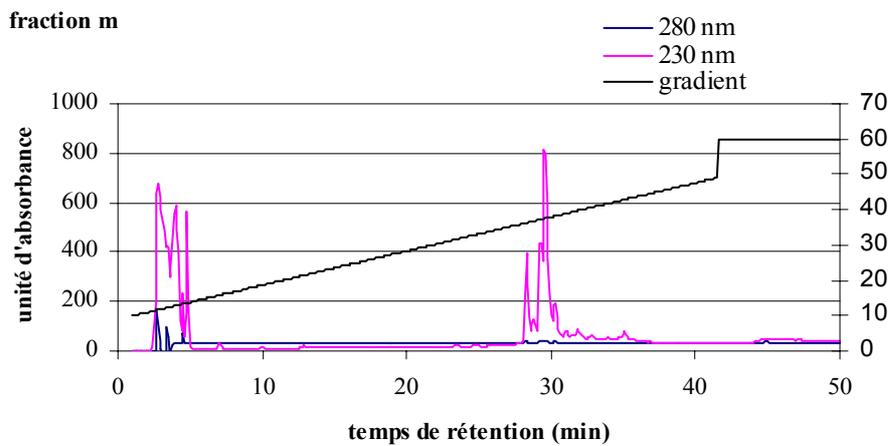
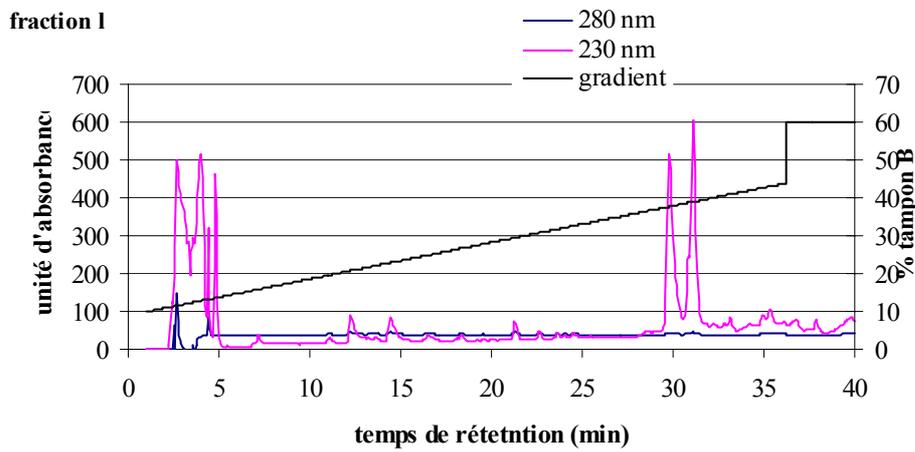
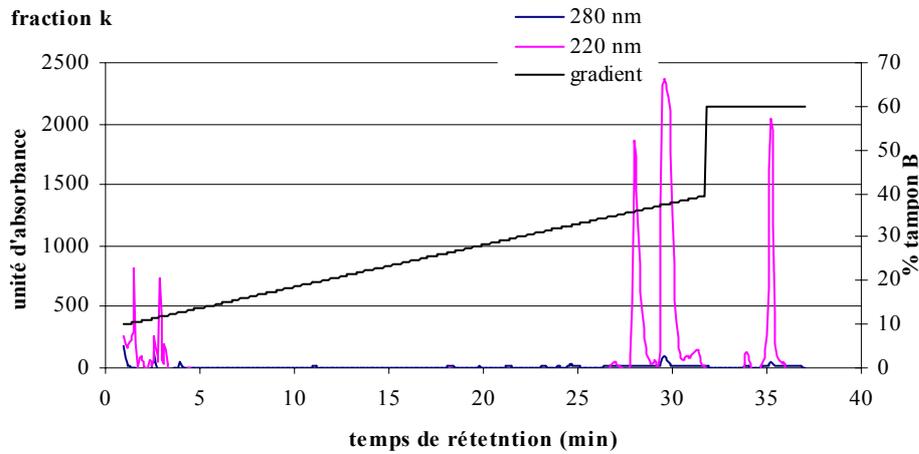
**fraction i**



**fraction j**

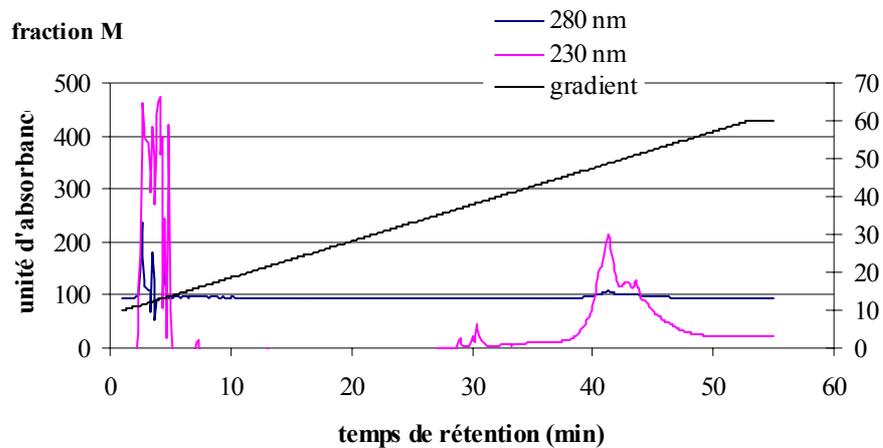


Annexe IV: Chromatogrammes des purifications des fractions du premier fractionnement d'hydrolyse d'Ara h 2 sur colonne en phase inverse analytique C2/C18.



Annexe IV: Chromatogrammes des purifications des fractions du premier fractionnement d'hydrolyse d'Ara h 2 sur colonne en phase inverse analytique C2/C18.

---



Annexe V : sérums fournis par les partenaires du programme européen

Partner 3 results									Partner 4 results		
	ID	gender	Serum (S) Plasma (P)	date of birth	RAST (peanut)	RAST (milk)	RAST (others)	symptoms after allergen (peanut) exposure	anti whole peanut IgE (UI/ml)	anti Ara h 1 IgE (UI/ml)	anti Ara h 2 IgE (UI/ml)
2124	KD	f	P	01/05/1998	6	1	strawberry 2, milk 1, weat 1, hasselnut almond 3	urticaria, breathlessness, bronchial obstruction	340	32	80
1703	DC	m	S	25/02/1997	4			urticaria	63	26	55
1699	SM	f	S	08/10/1979	3		grass mix 4, mugwort, birch 2	gastrointestinal symptoms	6	2,5	0
1698	ML	f	S	03/11/1978	4		grass mix 4, birch 3, mugwort 2, apple 1	breathlessness, bronchial obstruction	31	5	10
1695	SS	f	S	14/07/1986	6		grass mix 6, bet v 1 and bet v 2 5	gastrointestinal symptoms	950	622	619
1692	HO	m	S	29/09/1995	6		cat 2	asthma, angiodema	467	241	412
1693	HO	m	S	29/09/1995	6		cat 2	asthma, angiodema	1172	706	1493
1700	HO	m	S	29/05/1995	6		cat 2	asthma, angiodema	432	194	370
1686	TM	m	S	27/08/1976	3		grass mix 5, birch 2, cat 1	gastrointestinal symptoms	3,2	0	0
1685	SC	m	S	20/06/1992	4	2	cat 4, horse, dermatophagoideq pteronissinus 3	asthmatic symptoms	9	5	
1682	PH	m	S	20/01/1971	5		birch 2, dermatophagoides pteronissinus 1	severe reactions!!! Angiodema, anaphylaxis	145	62	55
1681	GR	m	S	12/06/1971	6		dermatophagoides pteronissinus 5, grass mix 3, muld mix, ficus benjamina 2	breathlessness, bronchial obstruction	1131	570	866
1673	NC	m	S	07/08/1988	6		soy 4, grass 3, dog, dermatophagoides pteronissinus 2	breathlessness, bronchial obstruction	912	334	561
1683	BM	f	S	12/04/1970	3		betv 1 3, cat 1	breathlessness, bronchial obstruction	4	2	0
1702	HE	f	S	17/07/1947	3		birch 5, soy 2	breathlessness, bronchial obstruction	0	0	0
1701	RS	f	S	29/08/1986	3		sesam, peanut, almond, soy, coconut 3, cacao 1	urticaria	6,5	1,3	0
1704	KP	m	S	26/05/1992	4(n sse mix)		grass, birch3, cat 1	gastrointestinal symptoms	30	14	19
1691	TT	m	S	19/07/1984	5		grass mix, alternaria 3, dermatophagoides pteronissinus 1	breathlessness, bronchial obstruction, gastrointestinal symptoms	106	53	68
1679	ES	m	S	26/12/1992	6	4	cat, dermatophagoides pteronissinus, soy 6, ovalbumin, weat 5, fish, alternaria 3	relevance of allergic symptoms unclear	2387	1041	636
1705	WE	m	S	15/02/1971	4	4	cladosporum 5, ovalbumin 3, latex, wesp toxin, penicillin V/G 2	asthma, urticaria	22	8	27

Annexe V : sérums fournis par les partenaires du programme européen

Partner 3 results									Partner 4 results		
	ID	gender	Serum (S) Plasma (P)	date of birth	RAST (peanut)	RAST (milk)	RAST (others)	symptoms after allergen (peanut) exposure	anti whole peanut IgE (UI/ml)	anti Ara h 1 IgE (UI/ml)	anti Ara h 2 IgE (UI/ml)
1696	SI	f	S	26/09/1959	3		birch 5, grass pollen 3		0,6	0	0
2202	PP	f	S	03/04/1988	5	5	birch 6, grass pollen mix 4, egg 2		149	56	74
2203	SJ	m	S	20/05/2000	3	6	nut mix 5, egg 4, ficus Spp, Kn uel grasspollen 2		25	14	2,5
1677	BR	f	S	02/06/1967	3	2	Der p, birch, wheat 2, egg 1	atopic eczema, rhinitis, asthma bronchiale	1,3	0,1	0
2204	RC	m	S	11/07/1957	3	3	cat, sojabean, hasselnut 3, paranut, almond, coconut 2	milk-->urticaria, peanut -- >quincke edema, anaphylaxis, oral allergy syndrom	4,5	2,2	0
2205	WM	m	S	13/09/1979	5		hasselnut3, cat 2	gastro-intestinal symptoms, oral edema, bronchial obstruction	45	29	5,5
2206	TP	m	S	12/06/1985	5		cat, wheat, hasselnut, coconut 3, egg, paranut, almond 2	gastro-intestinal symptoms, oral edema, anaphylaxis	106	39	0
2207	GJ	m	S	27/10/1977	4		cat, wheat, sojabean, hasselnut, paranut, coconut, almond 2		42	25	4,5
2208	PA	m	P	01/08/1981	3		cat 2	gastro-intestinal symptoms, oral edema	18	10	0,4
2209	HK	f	P	26/06/1977	6	2	lieschgras, rye, birch 6, cat, dog, hasselnut, coconut 4, paranut 3, ragweed, cladosporum herbarum, egg, wheat 2	bronchial obstruction, anaphylaxis	250	91	68
2210	BB	m	S	03/07/1977	3			oral edema	5	3	0
2211	BV	f	P	31/07/1995	6		sojabean, hasselnut, almond 4, egg 3, wheat, Der. P., paranut, coconut, alpha lactalbumin 2		362	171	25
2401	MK	m	S	20/06/1994		2	Grass pollen mix (2), dermatophagoides pteronissinus, ovalbumin (1)		0		
2402	BH	f	S	22/06/1924		2			0		
2403	KC	m	S	19/01/1996		2	dermatophagoides pteronissinus, cat (5), kn uelgrass (3)		58		
2404	JA	f	S	24/03/1999			ALA u. B-Cas (2)		0		
2405	FA	m	S	11/11/2000		2			0		
2406	GH	m	S	04/05/1998			Casein (2) ALA (1) ovalbumin (2)		0		

Annexe V : sérums fournis par les partenaires du programme européen

Partner 3 results									Partner 4 results		
	ID	gender	Serum (S) Plasma (P)	date of birth	RAST (peanut)	RAST (milk)	RAST (others)	symptoms after allergen (peanut) exposure	anti whole peanut IgE (UI/ml)	anti Ara h 1 IgE (UI/ml)	anti Ara h 2 IgE (UI/ml)
2407	SM	m	S	23/11/1987	2		dermatophagoides pteronissinus, dermatophagoides microceras, Birch, (5), lieschgrass, kn uelgrass, rye (4), Cladosporium herbarum, alternaria tenuis, cat (3), penicillium notatum, aspergillus fumigatus, dog, wheat, rice, latex hevea brasiliensis barley (2)		0		
2408	FM	m	S	23/03/1999	2	0	lieschgrass, rye(5), birch (3), mugwort		0		
2409	VJ	f	S	27/01/1999		2			0		
2410	SA	m	S	09/01/2000	2	0	cat, cladosporium herbarum (3), ovalbumin, lieschgrass, rye, birch, mugwort, wheat, soya, hasselnut, almond (2);		0		
2411	SJ	m	S	30/04/2001	2	2	dog (4), lieschgrass, cat, horse, ovalbumin (2);		0		
2301	KM	m	S	27/02/1988	3 (5,09)	0	rye, lieschgras, kn uelgrass, bee and wesp venom, wheat, soya (3), birch (2)		0		
2302	LS	f	S	27/09/1990	6 (>100)	2	hasselnut(4), ovalbumin wheat, soya, celery (2)	Bronchial obstruction after exposure to milk. Due to high peanut specific IgE no allergen challenge could be performed.	190		
2303	DC	f	S	07/01/82	3	0		eczema, GI-Symptoms, oral edema	1	0,55	0,05
2304	NT	m	S	14/10/79	6	0		GI-Symptoms, bronchial obstruction,	327	262	154
2305	AK	f	S	02/09/85				bronchial obstruction, oral edema, eczema, GI-symptoms	155	129	73
2306	TG	m	S	14/03/68	5	n.a.		anaphylaxy, bronchial obstruction, oral edema, eczema, GI-symptoms	39	34	19,5
2307	SB	f	S	18/04/79	2	0		anaphylaxy, bronchial obstruction, oral edema, eczema, GI-symptoms	0,3	0,4	0
2308	HS	f	S	03/07/74	4	0		oral edema, GI-symptoms	27	31	18

Annexe V : sérums fournis par les partenaires du programme européen

Partner 3 results									Partner 4 results	
	ID	gender	Serum (S) Plasma (P)	date of birth	RAST (milk)	RAST (peanut)	RAST (others)	symptoms after allergen (milk) exposure	anti blg IgE	anti casein IgE
2001	AS	f	P	10/10/1987	6		casein 6, alpha-lactalbumin 5, blg 4, hasselnut 2	asthmatic symptoms, urticaria	19,6	32,1
2004	RC	m	S	04/09/1991	3				0	0
2010	BB	m	P	20/09/1984	3,8	3,6	peanut 3,8, ovalbumin 5, birch 4,5, dermatophagoides pteronissinus 4,2, dog 3,4		0	0
2011	RC	m	P	11/07/1957	3,6		birch 4, grass, mouse 4, mugwort 3,5, cladosporium3,3, ovalbumin 1,1		0	0,14
2125			P						0	1,2
1679	SE	m	S	26/12/1992	6	6	cat, dermatophagoides pteronissinus, soy 6, ovalbumin, weat 5, fish, alternaria 3	relevance of allergic symptoms unclear	9,7	6,1
1705	WE	m	S	15/02/1971	4	4	cladosporum 5, ovalbumin 3, latex, wesp toxin, penicillin V/G 2	asthma, urticaria	22	7,9
2009		f	P	20/07/1963	4				0	0
2124	KD	m	P	01/05/1998	6	3	strawberry 2, milk 1, weat 1, hasselnut almond 3	urticaria, breathlessness, bronchial obstruction	0	0
2204	RC	m	S	11/07/1957	3	3	cat, sojabean, hasselnut 3, paranut, almond, coconut 2	milk-->urticaria, peanut -- >quincke edema, anaphylaxis, oral allergy syndrom	0	0
2212	SE	f	S	07/11/1985	6		cat, birch, milkprotein, alpha-lactalbumin 4, dog, hassel pollen, alder, lieschgras, hasselnut, beta- lactoglobulin, casein 3		0	3,3
2202	PP	f	S	03/04/1988	5	5	birch 6, grass pollen mix 4, egg 2		1,2	6,6
2203	SJ	m	S	20/05/2000	6	3	nut-mix 5, egg 4, ficus Spp, kn uelgrasspollen 2		3,1	0
2214	WF	m	P/PBS 1/1	16/09/1997	6		sojabean, hasselnut 6, cat, dog, egg 4, lieshgras, tomato 3, birch, Der. P., chicken, orange, apple 2	atopic eczema, rhinitis, asthma, bronchopulmonary dysplasia	0	0
2215	KN	m		18/10/2001	4		casein 4, alpha- actalbumin 3, Blg 2		0	0

Annexe V : sérums fournis par les partenaires du programme européen

Partner 5 results										Partner 4 results	
	ID	gender	Serum (S) Plasma (P)	age	FEIA CAP system units		FEIA CAP system units	RAST (others)	symptoms after allergen (milk) exposure	anti blg IgE	anti casein IgE
					blg	casein	peanut				
m1	TL	m	S	4 yrs	5,25	0,71	-	-	Generalized urticarial, angioedema, sneezing	50,9	138,5
m2	?	m	S	3 yrs	>100	>100	-	-	Urticaria, angioedema, cough, wheezing	18,7	79,1
m3	K	m	S	3 yrs	14	31,2	-	-	Angioedema, acute vomiting	4,6	7,1
m4	?	f	S	17 months	4,73	17,2	-	-	Urticaria, sneezing, cough	4,8	31,3
m5	?	m	S	30 months	13,3	20,7	-	-	Urticaria, hoarseness, laryngeal edema, vomiting	6,2	14,7
m6	?	m	S	2 yrs	1,97	81,5	-	-	Urticaria, vomiting, diarrhea, restlessness	0,4	3,4
m7	SL	m	S	2 yrs	39	>100	-	-	Sneezing, cough, vomiting, shock	0,15	4,7
m8	LL	m	S	17 months	17	17	-	-	Angioedema, vomiting, diarrhea	1,2	9
m9	LT	m	S	11 months	17,5	31,6	-	-	Urticaria, angioedema, vomiting, shock	3,7	6,7
m10	GM	f	S	11 months	22	9,57	-	-	Sneezing, cough, wheezing	0	0
m11	K	m	S	19 months	5,25	0,71	-	-	Sneezing, cough	0	0
m12	KA	m	S	3 yrs	4,89	34,4	-	-	Urticaria, restlessness, eye swelling	0	0,7
m13	DM	m	S	3 yrs	1,97	81,5	-	-	Urticaria, tearing, cough, dyspnea	0	49
m14	M	m	S	2 yrs	3,16	13,6	-	-	Eye swelling, erythema, drowsiness, sneezing, rhinorrhea, vomiting	1,7	0
m15	TR	m	S	7 yrs	10,8	43,2	-	-	Vomiting with upon ingestion of milk, atopic dermatitis	0	6
m16	DM	m	S	3 yrs	0,51	3	-	-	vomiting and urticaria upon ingestion of milk at age of 6mos, now tolerating	0	0
m17	?	m	S	15 months	0,35	5,2	-	-	Urticaria	0	0
m18	DB	m	S	2,5 yrs	0,38	14	-	-	Atopic dermatitis	0	1,7
m19	RC	m	S	8 yrs	1,11	>100	12,6	-	Bloody stool, vomiting, urticaria, systemic anaphylaxis, never ate peanut	5,7	27
m20	L	m	S	6 yrs	20	47	35,4	-	atopic dermatitis, never ate peanut	0	3,2
m21	MM	m	S	2 yrs	4,74	17,2	-	-	Urticaria, vomiting	0	1,1
m22	ZN	m	S	4 yrs	1,14	41,1	-	-	Food allergy to wheat, atopic dermatitis, never had milk	0	2,7
m23	N	m	S	3,5 yrs	30,3	83,5	-	-	Atopic dermatitis, food allergy to egg and fish. Never had milk	0	8,6
m24	MK	m	S	3 yrs	11,4	24,9	-	-	Diffuse erythema and vomiting with milk, food allergy to egg, asthma, rhinitis	1,7	0,6

**A**

---

Aalberse,RC. Food Allergens. *Environ Tox Pharm.*, **1997**, 4, 55-60.

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

Argos,P., Narayana,S.V., Nielsen,N.C. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *EMBO*, **1985**, 4, 1111-1117.

Arthur,J.C., Jr. Peanut protein; isolation, composition, and properties. *Adv. Protein Chem.*, **1953**, 8, 393-414.

Astwood,J.D., Leach,J.N., Fuchs,R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14, 1269-1273.

**B**

---

Baehler,P., Chad,Z., Gurbindo,C., Bonin,A.P., Bouthillier,L., Seidman,E.G. Distinct patterns of cow's milk allergy in infancy defined by prolonged, two-stage double-blind, placebo-controlled food challenges. *Clin Exp. Allergy*, **1996**, 26, 254-261.

Bannon, GA., Shi, D., Maleki, S., Kopper, R., Burks, AW. Tertiary structure and biophysical properties of a major peanut allergen, implication for the production of a hypoallergenic protein. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1999**, 118, 315-316.

Barnett,D., Baldo,B.A., Howden,M.E. Multiplicity of allergens in peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1983**, 72, 61-68.

Barnett,D., Bonham,B., Howden,M.E. Allergenic cross-reactions among legume foods--an in vitro study. *J Allergy Clin Immunol.*, **1987**, 79, 433-438.

Barnett,D. et Howden,M.E. Partial characterization of an allergenic glycoprotein from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, 882, 97-105.

Basha,S.M. et Al Wandawi,H. Composition, solubility, and gel electrophoretic properties of proteins isolated from Florunner (*Arachis hypogaea* L.) peanut seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **1976**, 24, 359-365.

Basha,S.M. et Pancholy,S.K. Identification of methionine-rich polypeptides in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed. *J Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 331-335.

Bateman,A., Birney,E., Cerruti,L., Durbin,R., Etwiller,L., Eddy,S.R., Griffiths-Jones,S., Howe,K.L., Marshall,M., Sonnhammer,E.L. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 276-280.

Becker W.M., Kleber-Janke T., Lepp U. Four Novel Recombinant Peanut Allergens : More Information, More Problems. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2001**, 124, 100-102.

- Becker,W.M. Characterization of Ara h 1 by two-dimensional electrophoresis immunoblot and recombinant techniques: new digestion experiments with peanuts imitating the gastrointestinal tract. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1997**, 113, 118-121.
- Bernard,H., Creminon,C., Yvon,M., and Wal,J.M. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1998**, 115, 235-244.
- Bernard,H., Meisel,H., Creminon,C., Wal,J.M. Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Lett.*, **2000**, 467, 239-244.
- Bernard,H., Paty,E., Mondoulet,L., Burks,A.W., Bannon,G.A., Wal,J.M., Scheinmann,P. Serological characteristics of peanut allergy in children. *Allergy*, **2003**, 58, 1285-1292.
- Bernhisel-Broadbent,J. et Sampson,H.A. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.*, **1989**, 83, 435-440.
- Bernstein,I.L. et Storms,W.W. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma.The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **1995**, 75, 543-625.
- Besler,M., Steinhart,H., Paschke,A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr. B Biomed. Sci Appl.*, **2001**, 756, 207-228.
- Beyer,K., Ellman-Grunther,L., Jarvinen,K.M., Wood,R.A., Hourihane,J., Sampson,H.A. Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 112, 202-207.
- Beyer,K., Morrow,E., Li,X.M., Bardina,L., Bannon,G.A., Burks,A.W., Sampson,H.A. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 107, 1077-1081.
- Bhushan, R, Reddy, GP, Reddy, KRN. Abstract of a review on chemistry of peanut proteins. *Adv.Protein Chem.*, **1988**, 39, 235-238.
- Bindslev-Jensen,C., Ballmer-Weber,B.K., Bengtsson,U., Blanco,C., Ebner,C., Hourihane,J., Knulst,A.C., Moneret-Vautrin,D.A., Nekam,K., Niggemann,B., Osterballe,M., Ortolani,C., Ring,J., Schnopp,C., Werfel,T. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods--position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*, **2004**, 59, 690-697.
- Bjornsson,E., Janson,C., Plaschke,P., Norrman,E., Sjoberg,O. Prevalence of sensitization to food allergens in adult Swedes. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **1996**, 77, 327-332.
- Bock,S.A. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, **1987**, 79, 683-688.
- Bock,S.A. et Atkins,F.M. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1989**, 83, 900-904.

- Bock,S.A., Lee,W.Y., Remigio,L.K., May,C.D. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. *J Allergy Clin Immunol*, **1978**, 62, 327-334.
- Bock,S.A., Munoz-Furlong,A., Sampson,H.A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 107, 191-193.
- Boldt,A., Fortunato,D., Conti,A., Petersen,A., Ballmer-Weber,B., Lepp,U., Reese,G., Becker,W.M. Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. *Proteomics*, **2005**, 5, 675-686.
- Bousquet,J., Bjorksten,B., Bruijnzeel-Koomen,C.A., Huggett,A., Ortolani,C., Warner,J.O., Smith,M. Scientific criteria and the selection of allergenic foods for product labelling. *Allergy*, **1998**, 53, 3-21.
- Burks,A.W., Cockrell,G., Connaughton,C., Karpas,A., Helm,R.M. Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara h II. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1995a**, 95, 607-611.
- Burks,A.W., Cockrell,G., Stanley,J.S., Helm,R.M., Bannon,G.A. Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest*, **1995b**, 96, 1715-1721.
- Burks,A.W., Shin,D., Cockrell,G., Stanley,J.S., Helm,R.M., Bannon,G.A. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 245, 334-339.
- Burks,A.W., Williams,L.W., Connaughton,C., Cockrell,G., O'Brien,T.J., Helm,R.M. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1992a**, 90, 962-969.
- Burks,A.W., Williams,L.W., Helm,R.M., Connaughton,C., Cockrell,G., O'Brien,T. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1991**, 88, 172-179.
- Burks,A.W., Williams,L.W., Thresher,W., Connaughton,C., Cockrell,G., Helm,R.M. 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.*, **1992b**, 90, 889-897.
- Burnett,G.R., Wickham,M., Fillery-Travis,A., Robertson,J.A., Belton,P.S., Gilbert,S.M., Tatham,A.S., Shewry,P.R., Mills,E.N. Interaction between protein allergens and model gastric emulsions. *Biochem. Soc. Trans.*, **2002**, 30, 916-918.
- Buschmann,L., Petersen,A., Schlaak,M., Becker,W.M. Reinvestigation of the major peanut allergen Ara h 1 on molecular level. *Monogr Allergy*, **1996**, 32, 92-98.

**C**

---

Chatel,J.M., Bernard,H., Orson,F.M. Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2003**, 131, 14-18.

Chung,S.Y., Butts,C.L., Maleki,S.J., Champagne,E.T.. Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 4273-4277.

Clark,A.T. et Ewan,P.W. Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance. *Clin Exp. Allergy*, **2003**, 33, 1041-1045.

Clarke,M.C., Kilburn,S.A., Hourihane,J.O., Dean,K.R., Warner,J.O., Dean,T.P. Serological characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy*, **1998**, 28, 1251-1257.

Creamer,L.K. Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, **1995**, 34, 7170-7176.

Crespo,J.F., Pascual,C., Burks,A.W., Helm,R.M., Esteban,M.M. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1995**, 6, 39-43.

**D**

---

Davis,P.J. et Williams,S.C. Protein modification by thermal processing. *Allergy*, **1998**, 53, 102-105.

de Blay,F., Grimfeld,A., Just,J. Histoire naturelle de l'allergie chez l'enfant. In *Les allergies, les comprendre et les prévenir*, Institut UCB, ed. Paris, **2004**, pp. 3-28.

de Boer,B.A., Kruize,Y.C., Yazdanbakhsh,M. In vitro production of IgG4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC): the contribution of committed B cells. *Clin Exp Immunol.*, **1998**, 114, 252-257.

de Jong,E.C., Van Zijverden,M., Spanhaak,S., Koppelman,S.J., Pellegroni,H., Penninks,A.H. Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin. Exp. Allergy*, **1998**, 28, 743-751.

Demoly,P., Bousquet,J., Manderscheid,J.C., Dreborg,S., Dhivert,H., Michel,F.B. Precision of skin prick and puncture tests with nine methods. *J Allergy Clin Immunol.*, **1991**, 88, 758-762.

Dreborg,S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. *Allergy*, **1993**, 48, 473-475.

Dutau, G., Juchet, A., Rancé, F., Feji, S., Nouilhan, P., Brémont, F. Chocs anaphylactiques par allergies alimentaires. *Rev.fr.Allergol.*, **1994**, 34, 409-417.

Dutau, G., Rance, F., Juche, A., Brémont, F. diagnostic d'une allergie alimentaire. <http://www.escolate.com/generale/allergiealimentairediag.htm> . **2005**.

Ref Type: Internet Communication

Dutau, G., Rancé, F., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A. Manifestations cutanées dans l'allergie alimentaire. Résultats préliminaires de l'enquête CICBAA (300 observations) avec référence particulière à la dermatite atopique en Pédiatrie. *Rev.fr.Allergol.*, **1996**, 36, 233-238.

## E

---

Eigenmann,P.A., Burks,A.W., Bannon,G.A., Sampson,H.A. Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1996**, 98, 969-978.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Feartherstone M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Bioch.Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95.

## F

---

Ferris,P.J., Woessner,J.P., Waffenschmidt,S., Kilz,S., Drees,J., Goodenough,U.W. Glycosylated polyproline II rods with kinks as a structural motif in plant hydroxyproline-rich glycoproteins. *Biochemistry*, **2001**, 40, 2978-2987.

Ford,R.P., Hill,D.J., Hosking,C.S. Cows' milk hypersensitivity: immediate and delayed onset clinical patterns. *Arch. Dis. Child*, **1983**, 58, 856-862.

Fries,J.H. Peanuts: allergic and other untoward reactions. *Ann. Allergy*, **1982**, 48, 220-226.

Fritsche R., Adel-Patient K., Bernard H., Martin-Paschoud C., Schwartz C, Ah-Leung S., Wal JM. IgE mediated mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine b-lactoglobuline. *Int. Arch. All. Immunol.*, **2005**, soumis.

Fu,T.J. Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. *Ann N Y. Acad Sci*, **2002**, 964, 99-110.

Fu,T.J., Abbott,U.R., Hatzos,C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. *J Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 7154-7160.

Furlong,T.J., DeSimone,J., Sicherer,S.H. Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *J Allergy Clin Immunol.*, **2001**, 108, 867-870.

## G

---

Goldman,A.S., Anderson,D.W., Jr., Sellers,W.A., Saperstein,S., Kniker,W.T., Halpern,S.R. Milk allergy. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics*, **1963**, 32, 425-443.

Grassi,J., Didierlaurent,A., Stadler,B.M. Quantitative determination of total and specific human IgE with the use of monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol.*, **1986**, 77, 808-822.

Grassi,J., Frobert,Y., Lamourette,P., Lagoutte,B. Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase: application to the peripheral proteins of photosystem I. *Anal. Biochem.*, **1988**, 168, 436-450.

Grassi,J., Frobert,Y., Pradelles,P., Chercuitte,F., Gruaz,D., Dayer,J.M., Poubelle,P.E. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods*, **1989**, 123, 193-210.

Gruber,P., Becker,W.M., Hofmann,T. Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of rAra h 2, a Recombinant Major Allergen from Peanut (*Arachis hypogaea*), Its Major Epitopes, and Peanut Agglutinin. *J Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2289-2296.

## H

---

Hales,B.J., Bosco,A., Mills,K.L., Hazell,L.A., Loh,R., Holt,P.G., Thomas,W.R. Isoforms of the major peanut allergen Ara h 2: IgE binding in children with peanut allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2004**, 135, 101-107.

Hansen,K.S., Ballmer-Weber,B.K., Luttkopf,D., Skov,P.S., Wuthrich,B., Bindslev-Jensen,C., Vieths,S., Poulsen,L.K. Roasted hazelnuts--allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy*, **2003**, 58, 132-138.

Hansen,K., Bindslev-Jensen,C., Skov,P., Sparholt,S., Hansen,G., Niemeijer,N., Malling,H., Poulsen,L. Standardization of food allergen extracts for skin prick test. *J. Chromatography B.*, **2001**, 756, 57-69.

Hanson,L. et Telemo,E. The growing allergy problem. *Acta Paediatr.*, **1997**, 86, 916-918.

Hill,D.J., Bannister,D.G., Hosking,C.S., and Kemp,A.S. Cow milk allergy within the spectrum of atopic disorders. *Clin Exp. Allergy*, **1994**, 24, 1137-1143.

Hill,D.J., Hosking,C.S., Reyes-Benito,L.V. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp. Allergy*, **2001**, 31, 1031-1035.

Hoffman D., Lowanstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A.E., Thomas W. Allergen Nomenclature. International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee . **1994**.

Ref Type: Internet Communication

Hoon,A.J., Choi,Y., Kim,S.G., Myung,K.Y., Do,C.Y., Seob,L.J. Expression of a Soybean Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Gene Is Correlated with Maturation of Roots. *Plant Physiol.*, **1998**, 116, 671-679.

Host,A. et Halken,S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy*, **1990**, 45, 587-596.

Hourihane,J.O., Bedwani,S.J., Dean,T.P., Warner,J.O. Randomised, double blind, crossover challenge study of allergenicity of peanut oils in subjects allergic to peanuts. *BMJ*, **1997a**, 314, 1084-1088.

## Références bibliographiques

---

Hourihane, J.O., Kilburn, S.A., Dean, P., Warner, J.O. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy*, **1997b**, 27, 634-639.

Hourihane, J.O., Roberts, S.A., Warner, J.O. Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ*, **1998**, 316, 1271-1275.

Husby, S., Schultz, L.F., Svehag, S.E. IgG subclass antibodies to dietary antigens in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, **1989**, 144, 88-92.

## I

---

Isolauri, E. Intestinal involvement in atopic disease. *J R. Soc. Med.*, **1997**, 90 Suppl 30, 15-20.

## J

---

Jacks, T.J., Hensarling, T.P., Muller, L.L., St Angelo, A.J., and Neucere, N.J. Peroxide-induced conformational transitions of peanut storage protein (arachin). *Int. J Pept. Protein Res.*, **1982**, 20, 149-153.

Jakobsen, C.G., Bodtger, U., Poulsen, L.K., Roggen, E.L. Vaccination for birch pollen allergy: comparison of the affinities of specific immunoglobulins E, G1 and G4 measured by surface plasmon resonance. *Clin Exp Allergy*, **2005**, 35, 193-198.

Jansen, J.J., Kardinaal, A.F., Huijbers, G., Vlieg-Boerstra, B.J., Martens, B.P., Ockhuizen, T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol.*, **1994**, 93, 446-456.

Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J.F., Bonnefoy, J.Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol.*, **1998**, 160, 3555-3561.

Johns, C. and Jones, D.B. The protein of the peanut, *Arachis hypogaea*. *J. Biol. Chem.*, **1916**, 28, 77.

Johnson, P. and Naismith, W.E. Further physico-chemical studies of the conarachin fraction of the globulins of the groundnut (*Arachis hypogaea*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1954**, 15, 377-389.

Jung, R., Scott, M.P., Nam, Y.W., Beaman, T.W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K., Nielsen, N.C. The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell*, **1998**, 10, 343-357.

## K

---

Kajosaari, M. Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr. Scand.*, **1982**, 71, 815-819.

Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol*, **2001**, 108, 133-140.

Kenna JG and Evans RM. Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist*, **2005**, 54, 141 (abstract).

Kinsella JE. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1979**, 56, 242-258.

Kleber-Janke,T., Cramer,R., Appenzeller,U., Schlaak,M., and Becker,W.M. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1999**, 119, 265-274.

Ko,T.P., Ng,J.D., McPherson,A. The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol*, **1993**, 101, 729-744.

Kokkonen,J., Tikkanen,S., Savilahti,E.. Residual intestinal disease after milk allergy in infancy. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **2001**, 32, 156-161.

Koppelman,S.J., de Jong,G.A., Laaper-Ertmann,M., Peeters,K.A., Knulst,A.C., Hefle,S.L., Knol,E.F. Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2. *Clin Exp Allergy*, **2005**, 35, 490-497.

Koppelman,S.J., Knol,E.F., Vlooswijk,R.A., Wensing,M., Knulst,A.C., Hefle,S.L., Gruppen,H., Piersma,S. Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*, **2003**, 58, 1144-1151.

Koppelman,S.J., Vlooswijk,R.A., Knippels,L.M., Hessing,M., Knol,E.F., van Reijssen,F.C., Bruijnzeel-Koomen,C.A. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*, **2001**, 56, 132-137.

Koppelman,S.J., Wensing,M., Ertmann,M., Knulst,A.C., Knol,E.F.. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy*, **2004**, 34, 583-590.

Kopper,R.A., Odum,N.J., Sen,M., Helm,R.M., Steve,S.J., Wesley,B.A. Peanut protein allergens: gastric digestion is carried out exclusively by pepsin. *J Allergy Clin Immunol.*, **2004**, 114, 614-618.

## L

---

Lalles,J.P. et Peltre,G.. Biochemical features of grain legume allergens in humans and animals. *Nutr. Rev.*, **1996**, 54, 101-107.

Lawrence,M.C., Izard,T., Beuchat,M., Blagrove,R.J., Colman,P.M. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J Mol. Biol.*, **1994**, 238, 748-776.

Lehrer,S.B., Horner,W.E., Reese,G. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **1996**, 36, 553-564.

Lessof,M.H., Kemeny,D.M., Price,J.F. IgG antibodies to food in health and disease. *Allergy Proc.*, **1991**, 12, 305-307.

Liccardi,G., Dente,B., Triggiani,M., Russo,M., Diamare,F., Massari,A., Pinzarrone,R., D'Isanto,R., Letizia,M., D'Amato,M., D'Amato,G. A multicenter evaluation of the CARLA system for the measurement of specific IgE antibodies vs. other different methods and skin prick tests. *J Investig. Allergol. Clin Immunol.*, **2002**, 12, 235-241.

## M

---

Maleki,S.J., Chung,S.Y., Champagne,E.T., Raufman,J.P. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2000a**, 106, 763-768.

Maleki,S.J., Kopper,R.A., Shin,D.S., Park,C.W., Compadre,C.M., Sampson,H., Burks,A.W., Bannon,G.A. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.*, **2000b**, 164, 5844-5849.

Maleki,S.J., Viquez,O., Jacks,T., Dodo,H., Champagne,E.T., Chung,S.Y., Landry,S.J. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 112, 190-195.

Maleki, S. J., Yamaki, K., Lewenson, C., Galeano, M., Champagne E.T., Shinohara, K. Roasting may alter the IgE binding epitopes and sensitizing ability of peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol.*, **2004**, 113[2], S154.

Marsh,D.G., Goodfriend,L., King,T.P., Lowenstein,H., Platts-Mills,T.A. *Allergen nomenclature*. Bull. World Health Organ, **1986**, 64, 767-774.

Maruyama,N., Adachi,M., Takahashi,K., Yagasaki,K., Kohno,M., Takenaka,Y., Okuda,E., Nakagawa,S., Mikami,B., Utsumi,S. Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *Eur. J Biochem.*, **2001**, 268, 3595-3604.

Meinert,R., Frischer,T., Karmaus,W., Kuehr,J. Influence of skin prick test criteria on estimation of prevalence and incidence of allergic sensitization in children. *Allergy*, **1994**, 49, 526-532.

Menardo,J.L., Bousquet,J., Rodiere,M., Astruc,J., Michel,F.B. Skin test reactivity in infancy. *J Allergy Clin Immunol.*, **1985**, 75, 646-651.

Mills E.N.C. and Shewry P.R. Plant Food Allergens., Mills E.N.C., Shewry P.R., eds. Blackwell Publishing, **2004**.

Mills,E.N., Jenkins,J.A., Alcocer,M.J., Shewry,P.R. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **2004**, 44, 379-407.

Mittag,D., Akkerdaas,J., Ballmer-Weber,B.K., Vogel,L., Wensing,M., Becker,W.M., Koppelman,S.J., Knulst,A.C., Helbling,A., Hefle,S.L., 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, 1410-1417.

Moneret-Vautrin,D.A. Food Allergy. *Ann. Pharm. Fr.*, **1999**, 57, 442-445.

Moneret-Vautrin,D.A., Kanny,G., Beaudouin,E. Allergie Alimentaire. Eléments de diagnostic clinique et biologique. *Feuillets de biologie*, **1996**, 37, 11-15.

Moneret-Vautrin,D.A., Kanny,G., Morisset,M., Rance,F., Fardeau,M.F., Beaudouin,E. Severe food anaphylaxis: 107 cases registered in 2002 by the Allergy Vigilance Network. *Allerg. Immunol* ,**2004**, 36, 46-51.

Moneret-Vautrin,D.A., Rance,F., Kanny,G., Olsewski,A., Gueant,J.L., Dutau,G., Guerin,L. Food allergy to peanuts in France--evaluation of 142 observations. *Clin. Exp. Allergy*, **1998**, 28, 1113-1119.

Moreno,F.J., Mellon,F.A., Wickham,M.S., Bottrill,A.R., Mills,E.N. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS J*, **2005**, 272, 341-352.

Morisset,M., Moneret-Vautrin,D.A., Kanny,G., Guenard,L., Beaudouin,E., Flabbee,J., Hatahet,R. Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin Exp. Allergy*, **2003**, 33, 1046-1051.

Murzin,A.G., Brenner,S.E., Hubbard,T., Chothia,C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol. Biol.*, **1995**, 247, 536-540.

## N

---

Negrioni,L., Bernard,H., Clement,G., Chatel,J.M., Brune,P., Frobert,Y., Wal,J.M., Grassi,J. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods*, **1998**, 220, 25-37.

Nelson,H.S. Diagnostic procedures in allergy. I. Allergy skin testing. *Ann. Allergy*, **1983**, 51, 411-418.

Neucere,N.J. Isolation of alpha-arachin, the major peanut globulin. *Anal. Biochem.*, **1969**, 27, 15-24.

Nichols,M.R., Moss,M.A., Reed,D.K., Hoh,J.H., Rosenberry,T.L. (2005). Rapid assembly of amyloid-beta peptide at a liquid/liquid interface produces unstable beta-sheet fibers. *Biochemistry*, **2005**, 44, 165-173.

Nielsen,N.C., Dickinson,C.D., Cho,T.J., Thanh,V.H., Scallon,B.J., Fischer,R.L., Sims,T.L., Drews,G.N., Goldberg,R.B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*, **1989**, 1, 313-328.

## O

---

Olivieri,V., Beccarini,I., Gallucci,G., Romano,T., Santoro,F. Capture assay for specific IgE. An improved quantitative method. *J Immunol Methods*, **1993**, 157, 65-72.

Osborne,T. The Vegetable Proteins., Longmans Green, ed. London, **1924**.

**P**

---

Pastorello,E.A., Incorvaia,C., Ortolani,C., Bonini,S., Canonica,G.W., Romagnani,S., Tursi,A., Zanussi,C. Studies on the relationship between the level of specific IgE antibodies and the clinical expression of allergy: I. Definition of levels distinguishing patients with symptomatic from patients with asymptomatic allergy to common aeroallergens. *J Allergy Clin Immunol.*, **1995**, 96, 580-587.

Petersen,A., Schramm,G., Schlaak,M., Becker,W.M. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. *Clin Exp Allergy*, **1998**, 28, 315-321.

Pichler,W.J. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann. Intern. Med.*, **2003**, 139, 683-693.

Piersma, SR., Gaspari, M., Hefle, SL., Koppelman, SJ. Proteolytic processing of the peanut allergen Ara h 3. *Mol. Nut. Food Res.*, **2005**, in press.

Plebani,A., Ugazio,A.G., Avanzini,A.M., Monafò,V., Burgio,G.R. An enzyme-linked immunosorbent assay for cow's milk protein-specific IgE using biotinylated antigen. Avoidance of interference by specific IgG. *J Immunol Methods*, **1986**, 90, 241-246.

Poms,R.E.et Anklam,E. Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. *JAOAC Int.*, **2004**, 87, 1466-1474.

Pradelles,P., Grassi,J., Chabardes,D., Guiso,N. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 447-453.

**R**

---

Report on skin test standardization. The Committee on Skin Test Standardization of The Netherlands Society of Allergology. *Clin Allergy*, **1988**, 18, 305-310.

Rabjohn,P., Helm,E.M., Stanley,J.S., West,C.M., Sampson,H.A., Burks,A.W., Bannon,G.A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J. Clin. Invest.*, **1999**, 103, 535-542.

Rajan,T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.*, **2003**, 24, 376-379.

Rance,F., Abbal,M., Lauwers-Cances,V. Improved screening for peanut allergy by the combined use of skin prick tests and specific IgE assays. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2002**, 109, 1027-1033.

Rance,F. et Dutau,G. Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1997**, 8, 41-44.

Rance,F., Kanny,G., Dutau,G., Moneret-Vautrin,D.A. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1999**, 10, 33-38.

Rawlings,N.D. et Barrett,A.J. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.*, **1995**, 248, 105-120.

Rico,M., Bruix,M., Gonzalez,C., Monsalve,R.I., Rodriguez,R. 1H NMR assignment and global fold of napin BnIb, a representative 2S albumin seed protein. *Biochemistry*, **1996**, 35, 15672-15682.

---

**S**

---

Sachs,M.I., Jones,R.T., Yunginger,J.W. Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1981**, 67, 27-34.

Sampson,H.A.. Food allergy. *JAMA*, **1997**, 278, 1888-1894.

Sampson,H.A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1999**, 103, 717-728.

Sampson,H.A. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 107, 891-896.

Sampson,H.A. 9. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2003**, 111, S540-S547.

Sampson,H.A. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, **2004**, 113, 805-819.

Sampson,H.A. and Burks,A.W. Mechanisms of food allergy. *Annu. Rev. Nutr.*, **1996**, 16, 161-177.

Sampson,H.A. et Ho,D.G. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol.*, **1997**, 100, 444-451.

Sampson,H.A., Mendelson,L., Rosen,J.P. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*, 1992, 327, 380-384.

Schocker,F., Luttkopf,D., Muller,U., Thomas,P., Vieths,S., Becker,W.M. IgE binding to unique hazelnut allergens: identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions. *Eur. J Nutr.*, **2000**, 39, 172-180.

Sellers, CL., Teuber, SS., Buchanan BB., Chen, L. Peanut Protein Digestibility: A Gastric and Intestinal Model. *J.Allergy Clin.Immunol.*, **2000**, 105[S140].

Sen,M., Kopper,R., Pons,L., Abraham,E.C., Burks,A.W., Bannon,G.A. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J. Immunol.*, **2002**, 169, 882-887.

Shin,D.S., Compadre,C.M., Maleki,S.J., Kopper,R.A., Sampson,H., Huang,S.K., Burks,A.W., Bannon,G.A. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 13753-13759.

Sicherer,S.H. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1999**, 10, 226-234.

Sicherer,S.H. Clinical update on peanut allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **2002**, 88, 350-361.

Sicherer,S.H., Burks,A.W., Sampson,H.A. Clinical features of acute allergic reactions to peanut and tree nuts in children. *Pediatrics*, **1998**, 102(1), e6.

Sicherer,S.H., Furlong,T.J., Munoz-Furlong,A., Burks,A.W., Sampson,H.A. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 108, 128-132.

Sicherer,S.H., Munoz-Furlong,A., Sampson,H.A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 112, 1203-1207.

Skassa-Brociek,W., Manderscheid,J.C., Michel,F.B., Bousquet,J. Skin test reactivity to histamine from infancy to old age. *J Allergy Clin Immunol.*, **1987**, 80, 711-716.

Skolnick,H.S., Conover-Walker,M.K., Koerner,C.B., Sampson,H.A., Burks,W., Wood,R.A. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 107, 367-374.

Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goetze,N.M., Olson,B.J., Klenk,D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, 150, 76-85.

Sorensen, HT., Nielsen, B., Nielsen, JO. Anaphylactic shock occurring outside hospitals. *Allergy*, **1989**, 44, 288-290.

Souci, SW. Food composition and nutrition table. Medpharm Scientific publications , **1994**.  
Ref Type: Journal (Full)

Sporik,R. et Hill,D. Allergy to peanut, nuts, and sesame seed in Australian children. *BMJ*, 1996, 313, 1477-1478.

Sporik,R., Hill,D.J., Hosking,C.S. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, egg and peanut in children. *Clin Exp. Allergy*, **2000**, 30, 1540-1546.

Stanley,J.S., King,N., Burks,A.W., Huang,S.K., Sampson,H., Cockrell,G., Helm,R.M., West,C.M., Bannon,G.A. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, 342, 244-253.

Staswick,P.E., Hermodson,M.A., Nielsen,N.C. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J Biol. Chem.*, **1981**, 256, 8752-8755.

Stoger,P. et Wuthrich,B. Type I allergy to cow milk proteins in adults. A retrospective study of 34 adult milk- and cheese-allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1993**, 102, 399-407.

Suhr,M., Wicklein,D., Lepp,U., Becker,W.M. Isolation and characterization of natural Ara h 6 : Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2004**, 48, 390-399.

Szabo,I. et Eigenmann,P.A. Allergenicity of major cow's milk and peanut proteins determined by IgE and IgG immunoblotting. *Allergy*, **2000**, 55, 42-49.

## T

---

Taylor,S.L. et Lehrer,S.B. Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev. Food Sci Nutr.*, **1996**, 36 Suppl, S91-118.

Taylor,S.L., Lemanske,R.F., Jr., Bush,R.K., Busse,W.W. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy*, **1987**, 59, 93-99.

Thomas,K., Aalbers,M., Bannon,G.A., Bartels,M., Dearman,R.J., Esdaile,D.J., Fu,T.J., Glatt,C.M., Hadfield,N., Hatzos,C., Hefle,S.L., Heylings,J.R., Goodman,R.E., Henry,B., Herouet,C., Holsapple,M., Ladics,G.S., Landry,T.D., MacIntosh,S.C., Rice,E.A., Privalle,L.S., Steiner,H.Y., Teshima,R., Van Ree,R., Woolhiser,M., Zawodny,J. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2004**, 39, 87-98.

Tombs,M.P. et Lowe,M. A determination of the sub-units of arachin by osmometry. Arachins A, B, and A1. *Biochem.*, **1967**, 105, 181-187.

## V

---

Vandenplas,Y. Epidémiologie. In Progrès en Pédiatrie, J.Navarro and J.Smitz, eds., **1993**, p. 18.

Vieths,S., Reindl,J., Moller,U., Hoffmann,A., Haustein,D. Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, 209, 379-388.

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

## W

---

Wal,J.M. Cow's milk allergens. *Allergy*, **1998**, 53, 1013-1022.

Wal,J.M. Structure and function of milk allergens. *Allergy*, **2001**, 56 Suppl 67, 35-38.

Wal,J.M. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, **2002**, 89, 3-10.

Wal,J.M., Bernard,H., Creminon,C., Hamberger,C., David,B., and Peltre,G. Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens. *Adv. Exp. Med Biol.*, **1995**, 371B, 879-881.

## Références bibliographiques

---

Warner,J.O. Peanut allergy: a major public health issue. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1999**, 10, 14-20.

Wensing,M., Penninks,A.H., Hefle,S.L., Koppelman,S.J., Bruijnzeel-Koomen,C.A., Knulst,A.C. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2002**, 110, 915-920.

Wide,L., Bennich,H., Johansson,S.G. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*, **1967**, 2, 1105-1107.

## Y

---

Yagami,T., Haishima,Y., Nakamura,A., Osuna,H., Ikezawa,Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol.*, **2000**, 106, 752-762.

Yocum,M.W., Butterfield,J.H., Klein,J.S., Volcheck,G.W., Schroeder,D.R., and Silverstein,M.D. Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1999**, 104, 452-456.

Yunginger,J.W., Ahlstedt,S., Eggleston,P.A., Homburger,H.A., Nelson,H.S., Ownby,D.R., Platts-Mills,T.A., Sampson,H.A., Sicherer,S.H., Weinstein,A.M., Williams,P.B., Wood,R.A., Zeiger,R.S. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.*, **2000**, 105, 1077-1084.

## Z

---

Zeiss,C.R., Grammer,L.C., Levitz,D. Comparison of the radioallergosorbent test and a quantitative solid-phase radioimmunoassay for the detection of ragweed-specific immunoglobulin E antibody in patients undergoing immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.*, **1981**, 67, 105-110.