Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires Mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson

Awatif Lifrani

▶ **To cite this version:**

Awatif Lifrani. Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires Mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0001 . pastel-00001928

HAL Id: pastel-00001928
https://pastel.hal.science/pastel-00001928

Submitted on 28 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS - GRIGNON
ECOLE DOCTORALE ABIES
UMR (914) Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire

Thèse présentée par

Mlle Awatif LIFRANI

Docteur vétérinaire

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

24 Février 2006

Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires
Mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson

Mr Gabriel PELTRE: rapporteur
Mr Michel LAURIERE: rapporteur
Mme Joëlle LEONIL: rapporteur

Mme Catherine PECQUET
Mr Michel LEGUAY
Pr Daniel TOME

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à mon directeur de thèse, Daniel Tomé, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr Michel Dubarry qui a su me faire bénéficier de son expérience et de sa compétence. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée en m'accordant une grande autonomie.

Un remerciement particulier à Mme Michelle Rautureau pour ces corrections et ces relectures averties. Elle a toujours su me consacrer son temps. Je la remercie aussi pour ces conseils et son soutien moral.

Je remercie aussi Mr Prosper Boyaka pour le temps qu'il a consacré à la correction de mon article.

Je remercie tous particulièrement Mme Joëlle Léonil, Mr Gabriel Peltre ainsi que Mr Michel Laurière qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie tous les membres de mon jury de thèse : Mme Catherine PECQUET, Mr Michel LEGUAY de me faire l'honneur d'assister à ma thèse.

Merci aussi à tous mes amis (e) et mes collègues du laboratoire qui se reconnaîtront ici. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite une bonne continuation.

Mes remerciements vont aussi à Mr Frédéric Derradji.

Merci enfin pour ma famille, en particulier à ma mère, pour son soutien et sa patience au long de ces années de thèse.

Summary

Allergic diseases are a common cause of illness in most industrialized countries. The prevalence of allergic disorders has been increasing in the past 10-15 years. Peanut, cow's milk, eggs and fish are strong allergens frequently found in many food products (flours, wines...). Therefore Codex Alimentarius called for the mandatory and comprehensive labelling of all products prepared with these proteins. Our purpose was to establish animal models producing specific immunoglobulin IgE and IgG1 to some food proteins (peanut, fish, albumin and casein) and developing anaphylactic reactions. First of all, we studied wine allergy in four strains of mice (C3H, CBA, DAB/2 and SJL). After the various steps of clarifying, we showed that the settling, filtration and ageing are important stages for the elimination of the proteins used for clarifying the wines. Then, we studied the cross reactivity of peanut-specific antibodies with lupine in four mouse strains. More specifically, C3H, CBA, SJL and BALB/c mice were sensitized with peanut. We showed that mice of different genetic backgrounds can be sensitized to peanut by ip injection to develop anti-peanut Abs that cross react with lupine. Cross-allergenicity may not directly correlate with the presence of cross-reactive Abs since no clinical symptoms of cross-allergenicity were seen after ip challenge with lupine. Lastly, we studied the antibody responses to peanut induced in mice after several routes of sensitization in the presence of several adjuvants. We showed that peanut given in the diet with or without adjuvant did not sensitize C3H and CBA mice or cause any allergies. In conclusion, the ip immunization in the presence of alum as an adjuvant remained the fastest means and most effective way to obtain a model of allergic mice.

Résumé

L'allergie alimentaire est actuellement inquiétante par sa fréquence dans les pays industrialisés. En effet, son incidence est en constante et rapide augmentation. Parmi les allergènes majeurs : l'arachide, le poisson, l'œuf et le lait de vache sont couramment trouvés dans de nombreux produits agro-alimentaires (farines, vins…) d'où l'obligation d'un étiquetage systématique. Notre objectif était d'établir des modèles de souris allergiques, à certaines protéines alimentaires (arachide, colle de poisson, albumine et caséine), caractérisés par la production *in vivo* d'IgE et d'IgG1 sériques spécifiques de ces protéines et par les manifestations cliniques suites aux tests de provocation avec ces mêmes protéines. Nous avons étudié, tout d'abord, l'allergénicité des vins sur quatre souches de souris (C3H, CBA, DAB/2 et SJL) après les différentes étapes du collage et nous avons montré que la décantation, la filtration et le vieillissement sont des étapes importantes pour l'élimination des produits utilisés pour la clarification des vins. Ensuite, nous avons étudié la réaction croisée arachide-lupin chez les souris C3H, CBA, SJL et BALB/c sensibilisées à l'arachide et nous avons montré que la réaction croisée arachide-lupin *in vitro* n'implique pas une allergie croisée arachide-lupin. Enfin, nous avons, expérimenté et comparé plusieurs approches et voies de sensibilisation pour identifier les facteurs environnementaux nécessaires à la manifestation de la réponse allergique. Nous avons conclu que la sensibilisation avec l'arachide par voie orale naturelle sur un modèle de souris sensibilisable (C3H et CBA), en présence et en absence d'adjuvant, ne provoque pas d'allergie. En conclusion, la voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant reste le moyen le plus rapide et le plus efficace pour obtenir un modèle de souris allergiques.

.

TABLES DES MATIERES

1- INTRODUCTION 9
1-1 Définition de l'allergie 9
1-2 Réaction d'hypersensibilité : classification selon Gell et Coombs 10
1-3 Les fonctions des cellules Th1 et Th2 12
1-4 Les anticorps impliqués dans l'hypersensibilité immédiate 13
1-4-1 Origine et structure des IgE 13
1-4-2 Les récepteurs aux IgE 14
1-4-3 Les cellules effectrices de la réaction allergique 16
1-4-3-1 Les cellules intervenant dans la phase précoce : mastocytes et basophiles 16
1-4-3-2 Les cellules intervenant dans la phase tardive de nature inflammatoire 17
1-4-4 Les principaux médiateurs chimiques de la réaction allergique 18
1-4-4-1 Les médiateurs préformés 18
1-4-4-2 Les médiateurs néoformés 20
1-4-4-3 Les cytokines 20
1-4-5 Les chimiokines 21
1-5 L'allergie alimentaire 21
1-5-1 Les caractéristiques de l'allergie alimentaire 21
1-5-2 Symptomatologie des allergies alimentaires 22
1-6 Différenciation entre allergie, intolérance et intoxication alimentaire 23
1-6-1 L'intolérance 23
1-6-2 Les intoxications alimentaires 24
1-7 Epidémiologie générale des allergies alimentaires 24
1-7-1 L'épidémiologie varie en fonction des paramètres étudiés 25
1-7-2 Les facteurs de risques 30
1-7-2-1 Les facteurs liés à l'individu 30
1-7-2-2 Les facteurs liés à l'environnement 31
1-7-3 Les principaux allergènes alimentaires 32
1-7-3-1 Les principaux allergènes d'origine végétale 32
1-7-3-2 Les principaux allergènes d'origine animale 36
1-8 Natures des allergènes alimentaires 38
1-8-1 Généralités 38
1-8-2 Structure des allergènes 39
1-9 Allergies croisées et réactivités croisées 40
1-9-1 Allergies croisées 40
1-9-2 Réactivité croisée 42
1-9-3 Réactions croisées et allergie croisée 43
1-10 Allergénicité 44
1-11 Diagnostic d'une allergie alimentaire 46
1-12 Traitement 48
1-13 Allergies alimentaires et modèles animaux 49
2- INTRODUCTION DU TRAVAIL 51

2-1 Risque allergique et vin 52
2-2 Risque allergique et réaction croisée arachide lupin 53

3- MATERIELS ET METHODES 55

3-1 Animaux 55
3-1-1 Souris 55
3-1-2 Lapins 55

3-2 Les allergènes 55
3-2-1 Les colles allergisantes utilisées pour la clarification du vin 55
3-2-1-1 Caséine 55
3-2-1-2 Colles de poisson 56
3-2-1-3 Albumine d'œuf 56
3-2-2 L'arachide 56
3-2-3 Le lupin 56

3-3 Adjuvants 56
3-3-1 Hydroxyde d'aluminium 56
3-3-2 Toxine cholérique 57
3-3-3 Adjuvants complet et incomplet de Freund 57
3-3-4 Maalox 57

3-4 Dosage des protéines 57

3-5 Immunisation des modèles animaux 57
3-5-1 Aux colles œnologiques 57
3-5-1-1 Chez le lapin 57
3-5-1-2 Chez la souris 58
3-5-2 A l'arachide 58
3-5-2-1 Immunisation par voie intrapéritonéale 58
3-5-2-2 Immunisation par voie orale 59

3-6 Evaluation de l'allergie 60
3-6-1 Signes biologiques : ELISA 60
3-6-2 Signes cliniques : test de provocation 61

3-7 Préparation des échantillons de vins collés au laboratoire 62
3-7-1 Caractéristiques des vins sélectionnés 62
3-7-2 Collage expérimental au laboratoire 62
3-7-2-1 Collage à la caséine 62
3-7-2-2 Collage aux Ichtyocolles 62
3-7-2-3 Collage à l'albumine 63

3-8 Préparation des échantillons de vins commercialisés 64
3-8-1 Vin de Bordeaux collé à l'albumine avec lysozyme (AaL) 64
3-8-2 Vins collés à la caséine (K) 65
3-8-3 Vins collés à la colle de poisson flocon (IF) 65

3-9 Allergénicité des produits de collage / tests de provocation 65
3-9-1 Les vins collés au laboratoire 65
3-9-2 Les vins commercialisés 65

3-10 Caractérisation immunochimique des antigènes/ allergènes 66
3-10-1 Analyses électrophorétiques des différentes colles 66
3-10-2 Révélation des allergènes avec les sérums : immuno-empreinte 66

3-10-3 Analyse électrophorétique des protéines contenues dans l'extrait d'arachide et dans la farine de lupin 66
3-11 Statistique 67
4- RESULTATS ET DISCUSSIONS 68
4-1 Mise au point d'un modèle de souris allergiques aux différentes colles œnologiques. Recherche de traces de ces colles dans le vin. 68
4-1-1 Résultats de l'analyse par électrophorèse des protéines contenues dans les différentes colles pures 68
4-1-2 Résultats de l'immuno-empreinte 68
4-1-3 La mise au point de modèles animaux sensibles à l'albumine, à la colle de poisson et à la caséine. 70
4 -1-3-1 Modèles lapins pour la production d'IgGt spécifiques anti-colles 70
4 -1-3-2 Modèles souris 70
4-1-4 Effets des différents échantillons de vins collés au laboratoire sur les C3H et DBA/2 sensibilisées aux différentes colles 74
4-1-5 Effets des différents échantillons de vins commercialisés sur les C3H et DBA/2 sensibilisées avec les colles 77
4-1-6 Discussion 78
4-2 Mise au point d'un modèle de souris allergique à l'arachide pour étudier les réactions allergiques croisées entre l'arachide et le lupin 84
4-2-1 Contenu en protéines de la préparation d'arachide 84
4-2-2 Contenu en protéines de la farine du lupin 84
4-2-3 L'analyse électrophorétique de la farine de lupin et de l'extrait d'arachide 84
4-2-4 Modèle de souris sensibilisés à l'arachide 84
4-2-4-1 Sensibilisation des différentes souches de souris à l'arachide par voie intra-péritonéale. **84**
4-2-5 Réactions croisées in vitro anti-lupin des souris immunisées à l'arachide 87
4-2-6 Discussions 88
4-3 Effets, sur la réponse immunitaire, de la voie d'administration, de la souche de souris et de la forme sous laquelle l'antigène est administré 93
4-3-1 Introduction 93
4-3-2 Sensibilisation des souris par voie i.p 93
4-3-3 Sensibilisation des souris par intubation gastrique 95
4-3-4 Sensibilisation des souris par voie buccale. 96
4-3-4-1 Consommation d'extrait d'arachide en absence et en présence d'alun (ip) 96
4-3-4-2 Consommation d'arachide sous forme de graine entière. 96
4-3-5 Discussion 97
5- CONCLUSION 104
6- PERSPECTIVES 106
7- BIBLIOGRAPHIE 107
8- SOURCES ELECTRONIQUE: **117**
9- ABREVIATIONS **118**
10- LEXIQUE **119**

11- PUBLICATION 123

Tableaux

Tableau 1 : Exemples de réactions d'hypersensibilité immédiate
Tableau 2: Les principaux symptômes gastro-intestinaux rencontrés lors d'allergies alimentaires (Sampson, 1999).
Tableau 3: Les principaux symptômes cutanés rencontrés lors d'allergies alimentaires (Sampson, 1999)
Tableau 4: Les sensibilisations les plus fréquentes chez 500 porteurs d'allergies alimentaires (André, 1992)
Tableau 5 : Les protocoles d'immunisations :
Tableau 6: Electrophorèse, après coloration au bleu de coomassie, de la caséine (A), de l'albumine (B) et du poisson (C) et après l'immuno-empreinte avec les sérums de souris et de lapins immunisés avec les trois colles et avec les sérums de patients allergiques au lait de vache, au blanc d'œuf et aux poissons
Tableau 7: Le rapport IgG1/IgG2a chez les différentes souches de souris sensibilisées aux différentes colles pures
Tableau 8 : Evaluation des stades cliniques observés à J_8 après le 1er test de provocation ip avec les colles pures (1 mg/ souris), chez les souches C3H, CBA et SJL (n= 3) et la souche DBA/2 (n= 4) immunisées à J_0 avec l'albumine (avec et sans lysozyme), la colle de poisson (flocon et préhydrolysée) et la caséine et à J_{16} après le 2ème test de provocation (i.p) consécutif à une 2ème immunisation à J_{11} chez les mêmes souches de souris
Tableau 9 : Le rapport IgG1/IgG2a anti-caséine chez les souris de la souche DBA/2 immunisée avec la caséine
Tableau 10: Evaluation, chez les souris sensibilisées, des stades cliniques (0-5) obtenus après les tests de provocation : A par voie i.p avec différents échantillons de lyophilisats de vins (cabernet Franc, Chenin, Sauvignon) à J_{15} et J_{21}, B par voie orale avec différentes colles pures à J_{35} sur la souche C3H immunisée avec AaL, AsL, IF, IS et la souche DBA/2 immunisée avec K. n = nombre de souris sensibilisées
Tableau 11: Les signes cliniques après les tests de provocation par voie i.p avec les échantillons des lyophilisats de vins commercialisés.
Tableau 12 : Les bandes protéiques (kD) des protéines d'arachide et du lupin obtenues par électrophorèse (SDS)
Tableau 13: Moyennes et écarts types des densités optiques (DO) pour les différents isotypes à spécificité anti-arachide pour chaque souche de souris à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45} (dilution des sérums: 1.10^{-5} sauf dosages IgE :1.10^{-1}. Rapport IgG1/IgG2a à J_{15}, J_{30} et J_{45}
Tableau 14: Nombre de souris dont le sérum est positif en IgE anti-arachide.
Tableau 15: Les tests de provocation par voie i.p avec l'extrait d'arachide. Evolution des signes cliniques et pourcentage de décès de souris ayant présenté des signes cliniques
Tableau 16: Nombre de souris dont le sérum contient des IgE à activité spécifique anti-lupin
Tableau 17: Moyennes et écarts types des densités optiques (DO) pour les différents isotypes à spécificité anti-lupin pour chaque souche de souris immunisées avec l'extrait d'arachide par voie i.p en présence d'alun à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45} (dilution des sérums: 4.10^{-2} sauf dosages IgE: 1.10^{-1}) Rapport IgG1/IgG2a à J_{15}, J_{30} et J_{45}
Tableau 18: Le rapport densité optique / bruit de fond à J_{-7} : <2 = - ; 2-3 = + ; 3-5 = ++ ; 5-7 = +++ ; 7-15 = ++++ ; >15 = +++++

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du FcεRI et de ses unités modulaires.
Figure 2 : Activation des mastocytes et des basophiles
Figure 3 : Action des médiateurs néoformés
Figure 4 : Les protagonistes de la réponse immunitaire
Figure 5 : Schéma des épitopes linéaires et conformationnels
Figure 6 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE, coloration bleu de Coomassie, suivie d'immunoblot sur la membrane de nitrocellulose avec les trois colles :
Figure 7: Les niveaux des IgG sériques spécifiques, mesurés à J_{-7}, J_{15}, J_{35} et J_{57}, chez les lapins immunisés par voie i.p avec l'albumine avec lysozyme, la colle de poisson flocon et la caséine
Figure 8 : Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) A : anti-albumine sans lysozyme, B : anti-albumine avec lysozyme, C : anti-colle de poisson flocon, D : anti-colle de poisson préhydrolysée et E : anti-caséine, mesurées à J_{14}, chez les souches C3H, CBA et SJL (n = 3) immunisées avec les différentes colles.
Figure 9: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-caséine mesurées à J_{-7}, J_{9}, J_{14} et J_{23}, chez les souris de la souche DBA/2 (n= 4)
Figure 10 : Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a, IgGt) anti-albumine sans lysozyme, anti-albumine avec lysozyme, anti-colle de poisson flocon, anti-colle de poisson pré-hydrolysée et anti-caséine, mesurés à J_{10} après le protocole d'immunisation avec les colles pures et à J_{20} après le premier test de provocation par voie i.p avec les lyophilisats de vins, chez les souris C3H et DBA/2 (caséine)
Figure 11: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide, mesurées à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45},chez les souris des souches C3H, CBA, Balb/c et SJL (n= 10) immunisées par voie i.p avec l'extrait d'arachide en présence d'alun
Figure 12: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide qui reconnaissent la farine de lupin, mesurées à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45}, chez les souris des souches C3H, CBA, Balb/c et SJL (n= 10) immunisées par voie i.p avec l'extrait d'arachide en présence d'alun
Figure 13: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par i.p avec l'extrait d'arachide en absence d'alun
Figure 14: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide sans adjuvant
Figure 15: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide associé à la toxine cholérique
Figure 16: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide associé en présence de maalox

1- INTRODUCTION

D'après les études épidémiologiques 20% des individus présenteraient une maladie allergique dont l'expression clinique est variable allant de signes discrets et épisodiques à la maladie grave de pronostic pouvant être fatal.

1-1 Définition de l'allergie

Les réactions allergiques et anaphylactiques sont connues depuis l'Antiquité, mais c'est seulement en 1902 que Richet et Portier étudient de façon précise une réaction de type anaphylactique chez le chien.

Le terme allergie crée en (1906) par **Von Pirquet** dérive du grec Allos (autre, différent) et Ergon (réaction), signifie d'une façon large, un ensemble de manifestations cliniques liées à une réponse anormale de l'organisme à l'introduction de substance(s) non toxique(s), faisant intervenir une réponse immunitaire excessive et/ou inadaptée spécifique de la (des) substance (s) en cause, et ne survenant que chez un nombre limité d'individus. Ce mot est devenu ensuite synonyme d'hypersensibilité, principalement d'hypersensibilité immédiate. L'antigène en cause est appelé allergène.

Le terme « maladie allergique » a été utilisé pour la première fois en 1911 par **Coca et Coke**. La maladie allergique est spontanée. Elle est provoquée par certaines substances dont les voies d'introduction dans l'organisme sont variées (inhalation, ingestion, contact cutané, injection). La population souffrant de maladie allergique est dite allergique. Le terme « atopie » a également été proposé par **Coca et Coke** en 1920 pour caractériser la prédisposition héréditaire à se sensibiliser à certaines substances de l'environnement selon un mécanisme d'hypersensibilité précoce provoqué par l'intermédiaire des immunoglobulines E (IgE). Un terrain atopique peut être présent sans pour autant que la réaction allergique se développe.

L'anaphylaxie se définit comme étant l'état contraire d'une protection. C'est l'état de sensibilité qui survient lors de la réintroduction de l'antigène chez un individu déjà sensibilisé à cet antigène. Les réactions d'hypersensibilité qui se produisent au cours de cette réintroduction, provoquent des réactions locales et/ou générales nocives pour l'organisme. L'anaphylaxie n'est présente que dans les cas d'hypersensibilité immédiate (de type I).

Symptôme	Allergènes en cause	Voies de pénétration	conséquences
Anaphylaxie	-Médicaments -Sérum -Venins d'hyménoptères	Intraveineuse Transcutanée	Œdème Vasodilatation Bronchospasme Arrêt circulatoire
Urticaire	-Piqûres d'insectes -Prick test ou IDR	Sous-cutanée	Vasodilatation Œdème
Rhino-conjonctivite **Asthme** **Certaines dermites atopiques**	-Pollens (arbres, graminées, herbacés…) -Acariens -Phanères d'animaux (chat, chien …)	Inhalation : -Voies respiratoires supérieures -Voies respiratoires inférieures	-Œdème de la muqueuse nasale -Bronchoconstriction -Augmentation de la sécrétion de mucus -Inflammation bronchique
Allergies alimentaires	Aliments (poissons, fruits de mer, œufs, farines …)	Digestive	-Urticaire -Diarrhée

Tableau 1 : Exemples de réactions d'hypersensibilité immédiate

1-2 Réaction d'hypersensibilité : classification selon Gell et Coombs

Cette classification a été établie par **Gell et Coombs** en fonction de la chronologie des réactions et de leurs mécanismes physiologiques. On distingue quatre grands types :

Les 4 grands types d'hypersensibilité :

Les réactions de Type I (immédiate, à médiation IgE): Elles se rencontrent dans le cas d'allergie des voies respiratoires supérieures (rhinite allergique), des voies respiratoires inférieures (asthme), dans l'eczéma atopique, dans le choc anaphylactique survenant avec les médicaments (curare, antibiotiques), ou les venins hyménoptères et dans la plus grande partie des allergies provoquées par les aliments (tableau 1).

Les réactions de Type II : cytotoxique et cytolytique : Elles mettent en jeu des IgG spécifiques capables d'activer le complément et de provoquer une destruction des cellules sanguines par allergie médicamenteuse (les cytopénies médicamenteuses). L'hypersensibilité de type II n'intervient que de manière exceptionnelle dans les réactions immunitaires déclenchées par les aliments.

Les réactions de Type III : semi-tardive, à complexes immuns : Elles mettent en jeu des complexes immuns circulants formés par l'association d'IgG ou IgE spécifiques avec l'allergène. Ces complexes précipitent dans les vaisseaux et entraînent des vascularites allergiques, la maladie sérique, des pneumopathies et néphropathies immuno-allergiques. Les réactions de type III peuvent théoriquement intervenir vis à vis des aliments par exemple dans les thrombopénies provoquées par les protéines du lait de la vache, les agrumes ou la quinine présente dans les boissons toniques.

Les réactions de Type IV : retardée, à médiation cellulaire : Elles impliquent des lymphocytes T spécifiques qui en présence de l'allergène entraînent la production de cytokines inflammatoires (LT CD4+) ou activent la cytotoxicité (LT CD8+). Elles concernent les eczémas de contact, la dermite atopique, l'allergie microbienne. L'hypersensibilité de type IV est probablement le mécanisme responsable de la maladie cœliaque et des formes entéropatiques d'intolérance aux protéines du lait de vache [1].

Les étapes de la réaction d'hypersensibilité de type I

En eux-mêmes les allergènes ne constituent pas un danger pour l'organisme, à la différence des virus et bactéries, mais le système immunitaire de certains individus les considère à tort comme tel et déclenche une réaction de défense de l'organisme contre cet intrus, réaction à

l'origine de la symptomatologie clinique. La réaction allergique immédiate IgE-dépendante de type I s'effectue classiquement en deux étapes : une phase de sensibilisation suivie de la réaction allergique proprement dite.

Première étape : **la sensibilisation**. Le premier contact de l'allergène avec le système immunitaire conduit à la production d'IgE spécifiques. L'allergène est pris en charge et apprêté par des cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les épitopes de l'allergène sont présentés aux lymphocytes T auxiliaires (T helpers, Th), en association à des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes Th reconnaissant le complexe CMH-épitope sont alors activés et sécrètent des cytokines dont le rôle est, entre autres, de réguler la réaction en modulant les coopérations cellulaires et moléculaires. Les lymphocytes T sont de deux types, Th1 et Th2, qui sécrètent des profils de cytokines différents. Les Th2 sont plus particulièrement impliqués dans les réactions d'hypersensibilité. Les cytokines sécrétées par les Th2 ($TCD4^+$ spécifiques de l'antigène), notamment l'IL-4, induisent, au niveau des lymphocytes B, la commutation isotypique des IgD membranaires, spécifiques de l'allergène, vers les IgE spécifiques. Les lymphocytes B sont activés et se transforment en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques. Ces IgE sont retrouvées pour une part dans la circulation sanguine. Les autres se fixent, par leur fragment Fc, sur les FcεRI des mastocytes et les basophiles, ces cellules sont alors dites « sensibilisées». Cette première étape, appelée phase de sensibilisation, muette cliniquement, prépare l'organisme à réagir de façon immédiate lors d'un second contact avec l'allergène [2].

Deuxième étape : **la réaction allergique proprement dite**. Le second contact avec l'allergène (ou un allergène de structure proche dans le cas des allergies croisées) entraîne une réaction qui s'accompagne de manifestations cliniques. L'allergène va se fixer sur les IgE immobilisées sur les mastocytes et les basophiles. Cette fixation induit le pontage des IgE à la surface des cellules, les récepteurs aux IgE vont alors se rapprocher, s'agréger, entraînant une désorganisation de la membrane cellulaire et l'exocytose des granules contenant des médiateurs chimiques dont le principal est l'histamine ainsi que d'autres médiateurs (PGD2, leucotriènes, PAF) et des cytokines pro-inflammatoires. Outre leurs effets directs concernant la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire, ces médiateurs attirent d'autres cellules (granulocytes éosinophiles) dans le tissu lésé et favorisent les réponses allergiques. C'est au cours de ce deuxième contact avec l'allergène

que le sujet déclenche une manifestation clinique de nature allergique plus ou moins grave en fonction de chaque individu. Les IgE sont ainsi le support de la réaction d'hypersensibilité de type I (tableau 1).

1-3 Les fonctions des cellules Th1 et Th2

Les Th1 sont impliquées dans les réactions inflammatoires à médiation cellulaire comme les réactions d'hypersensibilité retardée ou l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires. Cette immunité est caractérisée par l'activation des macrophages et la production de lymphocytes T cytotoxiques [3]. Les cellules Th1 induisent des réponses immunitaires protectrices en favorisant la production d'anticorps dominée par l'isotype IgG2a chez la souris [4].

Les Th2 sont plutôt impliquées dans l'induction de réponses anticorps de type IgG1 et IgE et dans les phénomènes d'éosinophilie. La production d'IL-4 stimule les cellules B vers la production d'IgE et IgG1 chez la souris et d'IgE et d'IgG4 chez l'Homme [5, 6]. L'IL-5 est pour sa part, une cytokine permettant l'activation des éosinophiles mais également capable d'amplifier la production d'IgE. Ainsi, les cytokines de type Th2 sont fréquemment retrouvées dans les processus allergiques et dans les réponses à forte sécrétion en anticorps [7].

La description des sous-types 1 et 2 des lymphocytes auxiliaires chez la souris a permis de proposer chez l'homme une explication à l'inflammation observée dans l'asthme ainsi qu'à sa relation avec l'atopie. Les différences fonctionnelles entre lymphocytes Th1 et Th2 ont également permis de proposer une explication à l'augmentation récente de la prévalence de l'asthme et des maladies allergiques. Cette approche conduirait à développer des stratégies thérapeutiques inhibant la réponse Th2 associée à la production d'IgE et à l'inflammation due aux éosinophiles et à stimuler la réponse Th1 associée à la défense anti-infectieuse. Des travaux récents vont cependant à l'encontre d'un tel schéma, probablement trop simpliste. Il a en effet été démontré que la réponse Th1 (IFN_{γ}) pouvait être augmentée dans l'asthme. Par ailleurs, la stimulation de la réponse Th1 dans des modèles animaux d'hyperactivité bronchique n'améliore pas toujours les paramètres fonctionnels ou inflammatoires. Chez les asthmatiques, plusieurs études ont démontré que les traitements anti-asthmatiques permettant l'amélioration de la maladie pouvaient s'accompagner d'une augmentation de la réponse Th2. Au plan épidémiologique, la théorie dite hygiéniste expliquant l'augmentation de l'atopie par la baisse des infections et une réponse Th1 amoindrie, est également

contrecarrée par l'augmentation simultanée dans les mêmes populations de pathologies auto-immunes caractérisées par l'exacerbation de la réponse Th1. L'ensemble de ces observations remet donc en cause le dogme Th1/Th2 et suggère un schéma ou les deux types de lymphocytes auxiliaires contribuent au développement de l'atopie et de l'inflammation [8].

1-4 Les anticorps impliqués dans l'hypersensibilité immédiate

1-4-1 Origine et structure des IgE

Les IgE, dont la synthèse est contrôlée par les TCD4$^+$ spécifiques de l'antigène, sont issues d'un processus de commutation isotypique d'IgD spécifiques vers IgE. Elles sont synthétisées et excrétées par les lymphocytes B et les plasmocytes à IgE. Ces cellules possèdent des IgE de membrane, qui permettent de les identifier et de les dénombrer avec une certaine précision. Chez les individus non allergiques, le nombre des lymphocytes B et des plasmocytes à IgE est très faible (1% de la totalité des lymphocytes) dans le sang, la rate, et les ganglions lymphatiques sous cutanés. Il est un peu plus élevé (4%) dans les muqueuses respiratoires et digestives, et dans les ganglions lymphatiques annexés aux bronches.

Les IgE sont des immunoglobulines monomériques de PM 190 000. Elles sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques dont deux chaînes lourdes (H) comprenant un domaine variable et quatre domaines constants (Cε1, 2, 3, 4) et de deux chaînes légères (L) de même type soit κ soit λ. Il n'existe pas de sous classe d'IgE. Les IgE de type κ représentent environ les 2/3 des molécules d'IgE. Les IgE sont normalement 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 du mucus, vomissement et diarrhées) représentent en fait les changements anatomiques et physiologiques normalement mis en œuvre pour lutter contre les parasites, rôle « normal » des IgE. Les IgE ne traversent pas le placenta et ne fixent pas le complément. Les IgE se retrouvent dans le sérum mais aussi dans des sécrétions telles que la salive, les sécrétions nasales, les lames, les urines, les selles. Les concentrations sériques sont quasiment nulles à la naissance et augmentent progressivement jusqu'à atteindre 50 à 100 UI /ml chez l'adulte [9]. Du fait de leur niveau de synthèse faible et de leur catabolisme important (la demi-vie dans la circulation est 2,5 jours), les IgE sériques circulantes représentent, chez les individus non allergiques, une infime proportion des

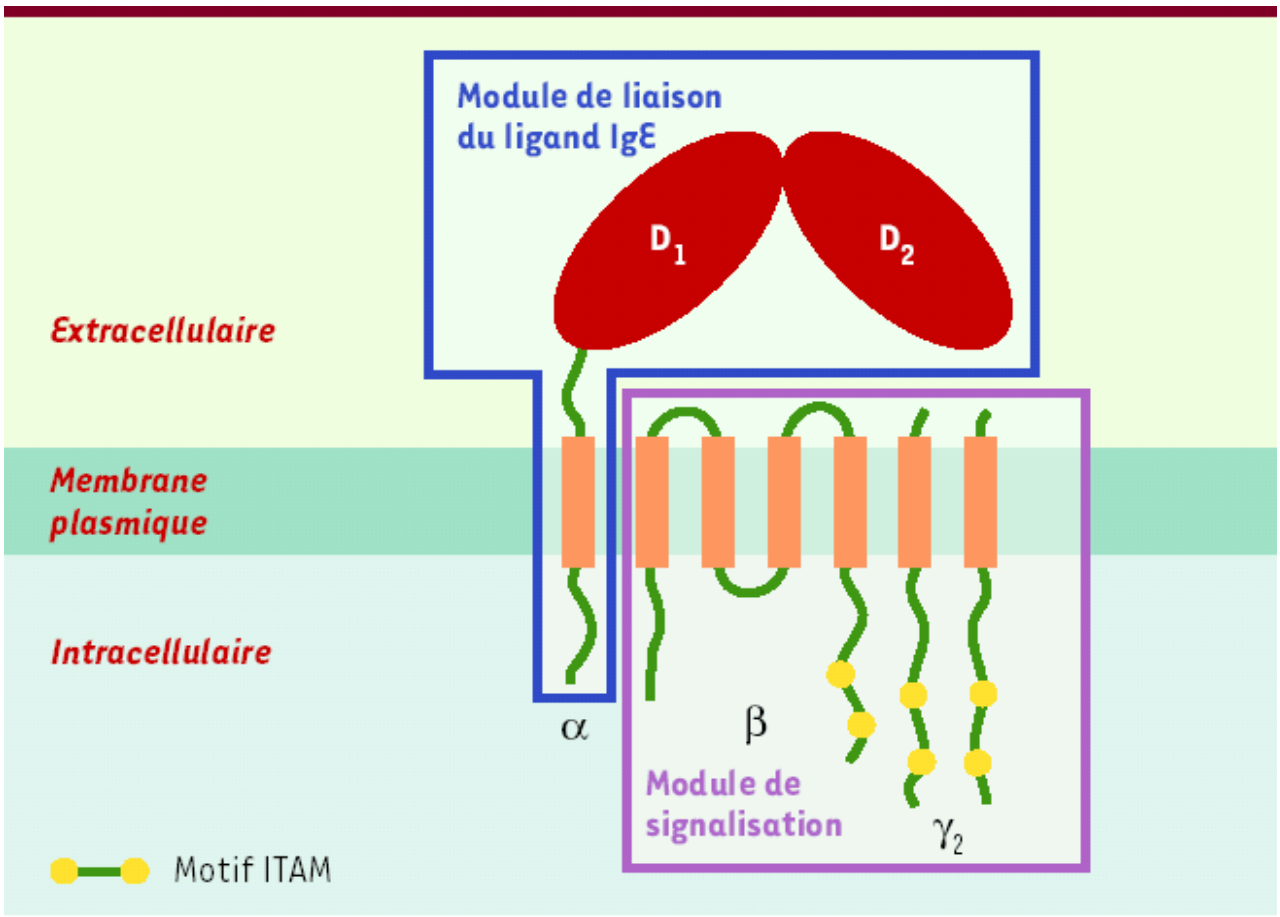

Figure 1 : Représentation schématique du FcεRI et de ses unités modulaires.
Le FcεRI est un tétramère composé d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'un dimère de chaînes γ liées par un pont disulfure. La chaîne α contient, dans sa portion extracytoplasmique, deux domaines apparentés à la superfamille des immunoglobulines, D1 et D2, qui représentent le module de liaison pour le ligand IgE. Les chaînes β et γ constituent le module de signalisation et comportent dans leur partie cytoplasmique un motif de signalisation, ITAM. La chaîne β aurait un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de signalisation du FcεRI.

anticorps circulants. Les IgE se fixent par leur fragment Fc sur la membrane des basophiles et des mastocytes, ce qui permet une prolongation de la demi-vie des IgE qui peut alors dépasser 3 à 4 semaines et aller jusqu'à 12 semaines. Le site de liaison des IgE à leur récepteur (FcεRI) se situe dans le domaine Cε3 et à la jonction Cε2-Cε3.

1-4-2 Les récepteurs aux IgE

On distingue deux types de récepteurs d'IgE : un récepteur de forte affinité FcεRI et un récepteur de faible affinité FcεRII (CD23) [10].

Le récepteur FcεRI, de forte affinité, est présent chez l'homme et les rongeurs sous forme tétramèrique (αβγγ). C'est un complexe membranaire constitutivement exprimé sur les cellules de l'anaphylaxie : mastocytes et basophiles (50 à 100 000 par cellule). Il est composé d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'un dimère de chaîne γ (figure 1).

La chaîne α est une protéine transmembranaire, formée d'une partie extracellulaire qui contient le site de liaison de l'IgE [11, 12], d'un segment transmembranaire et d'un segment cytoplasmique.

La chaîne β est une protéine très hydrophobe qui traverse quatre fois la membrane et dont les extrémités N et C terminales sont cytoplasmiques.

Les deux chaînes γ sont des protéines transmembranaires avec une courte partie extracellulaire et une région cytoplasmique très longue.

Les chaînes β et γ supportent le module de signalisation. Les régions cytoplasmiques C terminales de la chaîne β et des deux chaînes γ contiennent un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) nécessaire à l'activation cellulaire.

Chez l'homme ce récepteur peut exister aussi sous la forme trimérique (αγγ) sans la chaîne β. Il est exprimé d'une façon variable sur les cellules présentatrices d'antigène telles que les monocytes, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques du sang périphérique, mais aussi sur les éosinophiles et les plaquettes. Son niveau d'expression à la surface cellulaire est moins important que celui du tétramère de même que sa capacité de signalisation. La comparaison des deux formes montre que la chaîne β a un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de signalisation.

La régulation de l'expression du FcεRI est sous la dépendance des IgE monomériques qui ont la capacité d'augmenter son expression [13]. Cet effet est du à la stabilité du récepteur exprimé sur la membrane. La liaison des IgE avec le récepteur empêche la perte de ce

dernier. Il existe une bonne corrélation entre le niveau des récepteurs FcεRI et la concentration des IgE dans le sérum aussi bien chez la souris que chez l'homme. Etant donné l'augmentation des IgE spécifiques au cours des allergies, la présence de récepteurs FcεRI trimériques fonctionnels sur les cellules présentatrices d'antigène, telles que les monocytes, contribueraient à l'initiation et au maintien des réponses atopiques. Les monocytes des sujets normaux et atopiques expriment des récepteurs FcεRI(αγγ) qui peuvent servir dans la présentation d'antigène aux cellules T. Chez les donneurs normaux l'expression des FcεRI est variable (de 2 à 40 %, en moyenne 11%). Elle est rapidement perdue *in vitro* [14]. Le pontage des FcεRI empêcherait l'apoptose des monocytes par induction de Bcl2 et Bcl-xl, provoquerait la libération d'IL10 et altèrerait en culture la différenciation des monocytes soit en macrophages soit en cellules dendritiques [13, 15].

Le récepteur FcεRII de faible affinité, connu en tant que CD23 est chez l'homme une lectine de type C dépendante du $Ca2^{+}$. Il existe sous deux formes : CD23a, CD23b. Le CD23a constitutivement exprimé par les cellules B et qui est associé à l'endocytose des particules recouvertes d'IgE. Le CD23b, induit par l'IL-4, qui est présent sur les cellules T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages, les éosinophiles et qui entraîne la phagocytose des complexes IgE solubles. Le CD23 non protégé subit, à la surface de la cellule, un processus autocatalytique du a une métalloprotéase endogène. Il en résulte une série de fragments solubles les CD23s, de poids moléculaires différents qui induisent la différenciation des cellules B et des cellules T [16]. Le CD23 serait impliqué dans la synthèse des IgE, la forme membranaire induisant une réponse plus faible d'IgE, la forme soluble induisant une production spontanée d'IgE. En fait, le rôle majeur de CD23 *in vivo* serait un signal négatif pour la production d'IgE dans les modèles murins d'inflammation [17]. Le CD23 est aussi présent sur les cellules épithéliales. Il a été identifié sur la membrane apicale des entérocytes chez l'homme, avec une augmentation de l'expression dans les allergies alimentaires et les maladies inflammatoires de l'intestin [18]. Ce récepteur est retrouvé sur les entérocytes des souris et de rat normaux.

Chez le rat sensibilisé, l'augmentation du transport intestinal trans-épithélial de l'antigène est faite par l'intermédiaire des IgE liées aux CD23. La quantité d'antigène délivré à travers l'épithélium est augmentée par ce processus qui protège l'antigène de la dégradation. Un mécanisme similaire pour la captation d'antigène par les entérocytes existerait chez la souris [19]. Par sa capacité de s'associer avec un nombre différents de ligands, CD23 peut avoir

une influence à la fois simulatrice et inhibitrice sur la production d'IgE et les réponses inflammatoires.

1-4-3 Les cellules effectrices de la réaction allergique

L'activation par un allergène des mastocytes et des basophiles, dépendante des IgE, provoque la libération brutale de médiateurs vaso-actifs et constricteurs des fibres musculaires lisses, à l'origine des symptômes aigus. Les organes et tissus cibles de l'allergie immédiate sont également l'objet d'une réaction inflammatoire (phase tardive), entretenue et exacerbée par les expositions aux allergènes de l'environnement. Classiquement, les principales cellules qui produisent les médiateurs de l'allergie immédiate sont les polynucléaire basophiles et les mastocytes. D'autres cellules (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages, plaquettes, cellules endothéliales, cellules des épithéliums muqueux, et lymphocytes T) jouent également un rôle important dans la pathogénie de ces réactions.

1-4-3-1 Les cellules intervenant dans la phase précoce : mastocytes et basophiles

Les polynucléaires basophiles et les mastocytes, sont les principales cellules qui produisent les médiateurs de d'allergie immédiate. Elles contiennent des granulations métachromatiques qui sont la source principale des médiateurs chimiques de l'hypersensibilité immédiate. Elles constituent aussi la source majeure de cytokines qui régulent les fonctions des éosinophiles, cellules qui sont à la base de l'inflammation allergique et de sa persistance dans les tissus [20, 21].

Les mastocytes chez les rongeurs sont de deux types : les mastocytes muqueux (MMC : mucosal mast cells), très abondants au niveau des muqueuses respiratoires et digestives, et dont le développement est thymo-dépendant, et les mastocytes du tissu conjonctif (CTMC : connective-type tissue mast cells) abondants dans le péritoine et la peau, la sous-muqueuse digestive et respiratoire, les organes lymphoïdes centraux et périphériques [22]. Chez l'homme, les mastocytes peuvent aussi être classés en deux catégories, selon leur contenu en protéases. Les mastocytes T, qui se rapprochent des MMC murins, ne contiennent que de la tryptase et sont prédominants au niveau de la muqueuse intestinale, gastrique et nasale, et environ un tiers des mastocytes pulmonaires. Leur nombre est significativement augmenté dans la muqueuse nasale des malades atteints de rhinite allergique et dans la paroi et les secrétions bronchiques des asthmatiques. Les mastocytes TC, dont les granulations contiennent à la fois de la tryptase et de la chymase, sont prédominants dans la peau et la

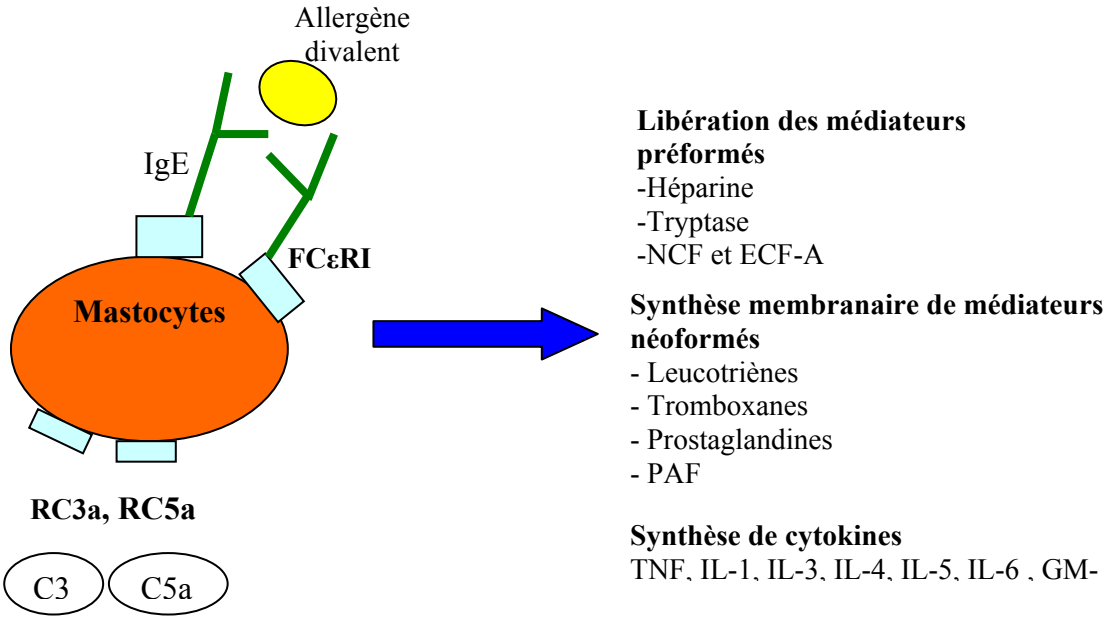

Figure 2 : Activation des mastocytes et des basophiles

sous muqueuse intestinale. Dans la muqueuse nasale de patients allergiques au pollen, on observe une augmentation saisonnière de nombre des mastocytes T, par contre le nombre des mastocytes TC ne varie pas et reste identique à celui retrouvé chez des sujets normaux. De même, les mastocytes T, qui constitue environ 1 % des cellules recueillies lors d'un lavage bronchoalvéolaire chez l'individu sain, passent à 5 % chez l'atopique [23].

Les polynucléaires basophiles (PNB) sont caractérisés par l'absence de tryptase et d'héparine dans leurs granulations [22]. Ce sont des cellules essentiellement circulantes, dont la durée de vie est de 2 à 3 semaines. La formule leucocytaire d'un sujet normal comporte moins de 0,5 % de basophiles. Une augmentation significative est observée chez les individus allergiques, notamment pendant les phases d'exposition à l'allergène. Leurs granulations intra-cytoplasmiques contiennent les médiateurs préformés : histamine, ECF-A (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis) et NCF (neutrphil factor of anaphylaxis) qui seront expulsés lors de leur activation (figure 2).

1-4-3-2 Les cellules intervenant dans la phase tardive de nature inflammatoire

Les polynucléaires éosinophiles (PNE) : ce sont probablement les principales cellules effectrices secondaires de l'allergie immédiate chez l'homme. Une hyper-éosinophilie est retrouvée dans l'atopie, les rhinites allergiques, la dermatite atopique et l'asthme [24]. Ce sont des cellules à localisation essentiellement tissulaire dont la prolifération est assurée par l'IL-5. Les éosinophiles contiennent un certain nombre de médiateurs préformés constitués d'enzymes, qui sont libérées dans le microenvironnement et le sang par les éosinophiles activés, il s'agit spécialement de la MBP (major basic protein), de l'ECP (eosinphil cationic protein), de l'EPO (eosinophil peroxydase) et de l'EDN (eosinophil derived neurotoxin). Toutes ces toxines exercent à des degrés divers, des effets cytotoxiques, pro-inflammatoires, et neurotoxiques. Les éosinophiles activés libèrent également des médiateurs néoformés. Il s'agit du PAF, des leucotriènes, et des prostaglandines.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) : ce sont des cellules qui produisent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, histaminolibérateurs et vasoactifs, des protéases, tous susceptibles de participer à la réaction allergique.

Les lymphocytes T: ce sont des cellules qui jouent probablement un rôle non négligeable dans la pathogénie des réactions allergiques tardives du type immédiat. En effet, On observe couramment un infiltrat riche en lymphocytes T durant la phase tardive, de type inflammatoire des réactions allergiques. Il existe une augmentation significative de la

proportion des lymphocytes T activés dans le sang et la muqueuse bronchique des sujets atteints d'asthme sévère.

Les cellules monomacrophagiques, cellules présentatrices de l'antigène (CPA): ce sont des cellules qui jouent un rôle important dans la physiopathologie des réactions allergiques, et notamment de l'asthme. D'importantes quantités de macrophages sont présentes à la surface de l'épithélium bronchique et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire des asthmatiques.

Les CPA : essentiellement les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, ou les macrophages, ingèrent dans un premier temps l'antigène par un mécanisme d'endocytose, conduisant à la formation d'un endosome. Ce dernier fusionne avec un lysosome, formant un endolysosome. L'antigène est alors fragmenté en peptides ; ce sont ces peptides qui, associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe II seront présentés au récepteur des cellules T. Une fois activés, les macrophages libèrent des médiateurs directement et indirectement impliqués dans les réactions allergiques. La production des ces différents médiateurs est significativement plus importante chez les personnes allergiques.

Les plaquettes sanguines: elles pourraient également intervenir dans le processus inflammatoire allergique grâce à l'expression à leur surface de récepteurs FcεRII et FcγRII [23]. Le récepteur de haute affinité pour les IgE, FcεRI, est également présent à la surface des plaquettes. La stimulation des plaquettes, via ce récepteur, induit le relargage de sérotonine et de RANTES, les plaquettes joueraient donc un rôle dans le maintien de l'inflammation allergique [25].

1-4-4 Les principaux médiateurs chimiques de la réaction allergique

Plusieurs cellules, entre autres les mastocytes, les polynucléaires basophiles, les polynucléaires éosinophiles,… libèrent des médiateurs durant la réaction allergique.

1-4-4-1 Les médiateurs préformés

- **L'histamine** : Elle peut se définir comme l'un des principaux médiateurs impliqués dans la physiopathologie de l'allergie. Chimiquement, cette molécule est formée par décarboxylation de l'histidine, acide aminé naturel constituant des chaînes protéiques. Cette réaction se fait sous l'action d'une enzyme spécifique, l'histidine décarboxylase. L'histamine est alors stockée dans sa quasi-totalité dans les mastocytes et leucocytes. L'histamine sera

libérée dans l'organisme lors d'une réaction allergique, pendant la phase précoce de la réaction allergique. Elle est à l'origine des troubles survenant classiquement dans la phase immédiate de la réaction allergique. Une fois libérée dans l'organisme, l'histamine diffuse très rapidement dans les tissus environnants. Elle apparaît par exemple dans le sang au bout de 2 minutes et demie, un pic est observé à 5 minutes, elle revient à la normale en 30 minutes environ. Son mode d'action peut alors être comparé à celui d'un neuromédiateur. Lors de sa diffusion, l'histamine se fixe sur des récepteurs spécifiques et la dépolarisation membranaire qui suit l'activation du complexe histamine-récepteur permet la transmission de l'information. Ses récepteurs sont des glycoprotéines présentes dans les membranes cellulaires de différents organes, on a pu les classer en 3 catégories, aux conséquences physiologiques bien différentes:

Les récepteurs H1, sont situés au niveau des bronches, de la peau et des capillaires. L'activation de ces récepteurs entraîne une contraction des muscles, un accroissement de la perméabilité vasculaire donc des rougeurs, et enfin des démangeaisons.

Les récepteurs H2, présents sur les mêmes sites que les récepteurs H1, sont surtout localisés au niveau de l'estomac. Leur activation entraîne une hypersécrétion d'acide gastrique, une diminution de la sécrétion de la muqueuse des voies aériennes en même temps qu'une contraction oesophagienne.

Un troisième récepteur a été décrit au niveau du tissu neural et des poumons par l'équipe française de J-C Schwartz (1983). Il détermine une régulation négative (dit "auto-feedback négatif) de la synthèse d'histamine et agit concrètement comme un frein naturel à la production d'histamine.

La réaction allergique qui vient de se déclencher ne dure pas, car l'histamine s'élimine progressivement, atténuant les effets d'une crise allergique. Environ 2 à 3 % de l'histamine sont excrétés inchangés dans les urines. Le reste est métabolisé selon deux voies principales: 50 à 70 % sont transformés en N-méthyl-histamine par une N-méthyl-transférase, les 30 à 40 % restant étant transformés en acide imidazole-acétique par une diamine-oxydase ou histaminase .

- Les enzymes protéolytiques, la tryptase, la cathepsine G et la superoxyde-dismutase sont libérées par les mastocytes et les basophiles et ont un rôle dans la réponse inflammatoire.

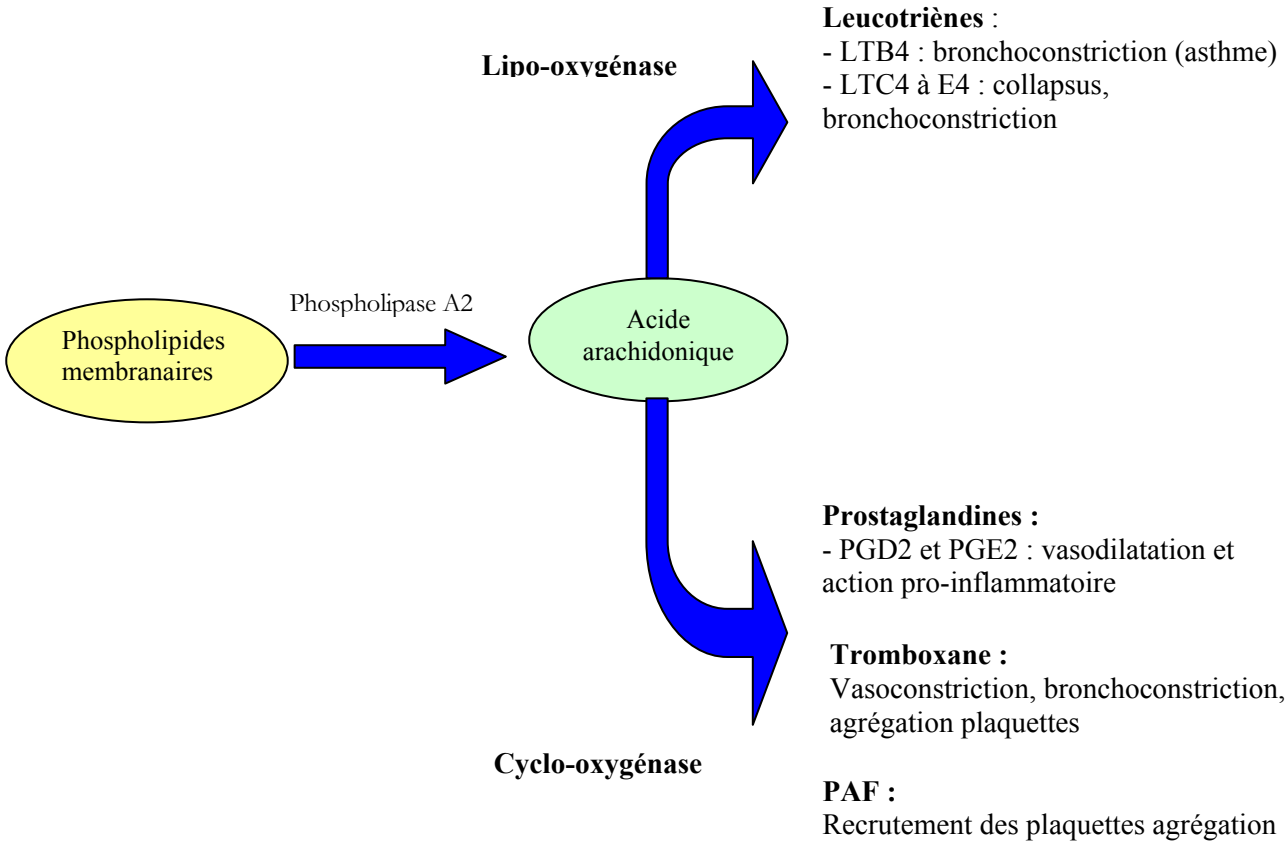

Figure 3 : Action des médiateurs néoformés

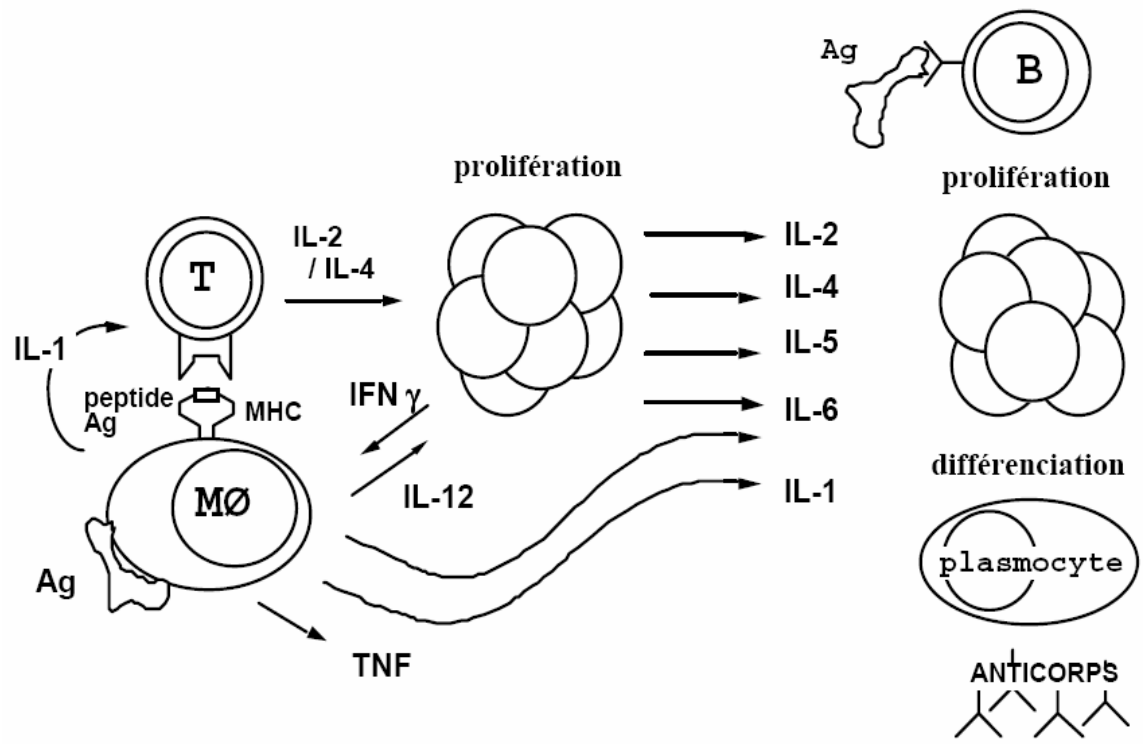

Figure 4 : Les protagonistes de la réponse immunitaire

- L'ECFA et le NCFA sont présents dans les granules de basophiles.

- Le MBP, l'ECP, l'EPO et l'EDN sont présents dans les granules des éosinophiles.

1-4-4-2 Les médiateurs néoformés

Les plus importants sont les médiateurs lipidiques. Les leucotriènes (LT), les thromboxanes (TX) et les prostaglandines (PG). Ils sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique (figure 3). Le Paf-acéther, provenant du métabolisme des lysophospholipides, est produit par un grand nombre de cellules (macrophages, neutrophiles, éosinophiles et plaquettes). C'est un puissant agrégeant plaquettaire qui a également un rôle important dans la contraction des muscles lisses bronchiques, il accroît l'hyper-réactivité bronchique et a des effets cardiaques et vasculaires importants [23].

1-4-4-3 Les cytokines

La réponse immunitaire spécifique est le fruit de l'interaction entre des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules présentatrices de l'antigène (figure 4). Cette coopération peut aboutir à la prolifération cellulaire, la production d'anticorps, la différenciation de cellules cytotoxiques, et à l'accroissement de l'hématopoïèse. La communication entre les cellules est assurée par des facteurs solubles: les cytokines. Les cytokines sont des glycoprotéines de faible masse moléculaire qui permettent la communication entre les cellules. Toute cellule dont l'activité est modifiée à la suite du message que constitue une cytokine, possède à sa surface un récepteur spécifique de cette cytokine. Le monde des cytokines est donc constitué, tant par des facteurs solubles que par des constituants membranaires. Ce qui distingue les cytokines des hormones, ce sont les nombreuses sources potentielles, le grand nombre de cellules cibles différentes, impliquant un large spectre d'action et des activités qui peuvent être aussi bien autocrines que paracrines, voire ne pas nécessiter de sécrétion et agir lors d'un simple contact membranaire. Certaines cytokines peuvent également agir de façon endocrine (ex. IL-1, IL-6, TNF ...). Enfin, il existe une forte redondance des activités, puisqu'un même effet peut être obtenu avec des cytokines différentes. Les productions spontanées de cytokines sont extrêmement faibles et ces médiateurs sont essentiellement produits lors d'une activation cellulaire. Parmi les cytokines qui activent le système immunitaire on note : les interleukines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12…), les lymphotoxines (TNF), les « Colony Stimulating Factor (surtout GM-CSF), les interferon (INF)…

1-4-5 Les chimiokines

Elles sont produites par de nombreux types cellulaires et dans des conditions appropriées. Elles sont constitutives ou inductibles et jouent un rôle crucial dans les réactions immunitaires et inflammatoires. Ce sont des substances chimiques douées de propriétés chimiotactiques vis à vis des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes. Il existe deux types de chimiokines, les C-X-C chimiokines et les C-C chimiokines : les deux premières cystéines (C) sont soit séparées par un acide aminé (X), soit adjacentes. Les chimiokines C-X-C exercent leur chimiotactisme surtout sur les lymphocytes et les PNN et les chimiokines C-C sur les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles [26]. L'infiltration tissulaire par ces différentes cellules, marque la phase retardée, de nature inflammatoire, de la réaction allergique. Cette phase se rencontre notamment dans l'asthme, la rhinite allergique et la dermatite atopique. Le recrutement cellulaire se fait en trois phases : adhésion aux cellules endothéliales, migration par diapédèse à travers la paroi des vaisseaux puis infiltration du tissu par mouvement chimiotactique.

1-5 L'allergie alimentaire

Dans la société occidentale, une personne consomme en moyenne entre 2 et 3 tonnes de vivres au cours de sa vie (0,5Kg-1 Kg/jour (minimum : 1 pot de yaourt : 125 g) soit 0,18-0,36 tonnes/an soit 11-22 t/60 ans). Il n'est donc guère surprenant que des tableaux pathologiques chroniques soient souvent mis en rapport avec l'alimentation, et donc avec une allergie alimentaire. L'allergie alimentaire se définit comme une réaction anormale et exagérée du système immunitaire. Elle est liée à une réponse immuno-pathologique à un aliment ou un composant d'aliment (allergène) [27]. Elle est généralement provoquée par les IgE spécifiques et correspond à un état d'hypersensibilité immédiate de type I. Cependant, il existe d'autres formes d'allergie alimentaire non dépendante des IgE. Elles entrent dans la classe des hypersensibilités de type III (immunocomplexes) ou de type IV (hypersensibilité retardée) dans certaines formes d'eczéma atopique.

1-5-1 Les caractéristiques de l'allergie alimentaire

Elle n'affecte que les individus génétiquement prédisposés (atopiques). C'est l'association de l'aliment et du fond génétique qui définit l'allergène et non une caractéristique structurale physico-chimique intrinsèques [28]. Cependant, différents facteurs tels que les habitudes alimentaires, les conditions environnementales peuvent être des facteurs favorisants l'apparition de l'allergie. En aucun cas ils ne peuvent induire seuls une allergie. Si les

	Type	Caractéristiques
IgE dépendants	Hypersensibilité immédiate gastro-intestinale	- Nausées, douleurs abdominales, coliques, vomissement, diarrhées - Dégranulations tissulaires des mastocytes, muqueuses oedémateuses, péristaltisme altéré - Malabsorption, retard de croissance
	Syndrome oral allergique	- Picotement et angioedème des lèvres, de la langue, de la gorge -Activation des mastocytes locaux (réactions croisées entre les fruits et les légumes frais et les pollens de graminées et de bouleau)
Mixtes IgE/non IgE	Oesophagite, gastrite ou gastro-entérite allergique : Oesophagique Gastrique Gastro-entérique	- Infiltration dans l'œsophage, l'estomac ou la barrière intestinale d'éosinophiles, au niveau muqueux, musculaire ou séreux - Reflux, douleur abdominale, troubles du sommeil, irritabilité - Vomissements, anorexie, retard de croissance, obstruction gastrique - Perte de poids, retard de croissance
Non IgE	Syndrome d'entérocolite	- Dans les 1er mois (lait de vache, soja), vomissements, diarrhée, déshydratation - Sécrétion antigène- spécifique de TNFα
	Enthéropathie	- Dans les premiers mois (lait de vache, diarrhées, pas de prise de poids - Forte sécrétion d'IgA et IgG spécifiques
	Maladie cœliaque	-Atrophie des villosités intestinales, diarrhées graisseuses, dénutrition, dues au Gluten

Tableau 2: Les principaux symptômes gastro-intestinaux rencontrés lors d'allergies alimentaires (Sampson, 1999).

	Type	Caractéristiques
IgE dépendants	Urticaire aigue angioedème	Activation des mastocytes circulants possédants des IgE à leur surface Essentiellement le lait, l'œuf, les noix et cacahuètes
Mixte IgE/ non IgE	Dermatite atopique	Prurit ; association à l'asthme et à la rhinite allergique Role 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
Non IgE	Dermatite liée à l'enthéropathie (Gluten)	Prurit papulo-vésiculaire Dépôt d'IgA et présence de neutrophiles à la jonction derme-épiderme

Tableau 3: Les principaux symptômes cutanés rencontrés lors d'allergies alimentaires (Sampson, 1999)

mécanismes physicopathologiques de la phase déclenchante (phase II de réaction d'hypersensibilité de type I) de la réaction allergique sont bien connus (libération de médiateurs par les cellules effectrices entraînant l'apparition des symptômes cliniques) il n'en est pas de même pour la phase de sensibilisation (phase I de la réaction de type I), dont les mécanismes restent obscurs à ce jour et impliquent vraisemblablement une exposition minimale à l'aliment sensibilisant. Il n'existe pas de relation dose réponse généralisable pour la provocation et/ou la gravité d'une réaction allergique. En effet, des chocs anaphylactiques graves peuvent être déclenchés par ingestion de quantités minimes d'allergène (présent à l'état de trace) comme constituant naturel de l'aliment ou sous forme masquée (ajouté à des fins technologiques). Les seuils déclenchant et les réponses varient énormément d'un individu à l'autre.

1-5-2 Symptomatologie des allergies alimentaires

L'allergie alimentaire présente une symptomatologie clinique variée :

Des manifestations gastro-intestinales

Les manifestations digestives sont présentes dans 50 à 60 % des cas d'allergie alimentaire, et sont regroupées dans le tableau 2.

Des manifestations cutanées

Elles sont fréquentes et polymorphes, se trouvent dans 60% des cas d'allergie alimentaire et sont regroupées selon le même principe dans le tableau 3.

Des manifestations respiratoires

Elles concernent 20 à 30 % des cas d'allergies alimentaires. Ce sont essentiellement des réactions dépendantes des IgE, touchant l'ensemble de l'arbre respiratoire. Ces manifestations sont en général associées à des symptômes gastro-intestinaux ou cutanés.

Des réactions généralisées ou anaphylactiques :

Les allergies alimentaires représentent une des causes les plus fréquentes de réaction anaphylactique [29]. Il existe peu de données épidémiologiques. Néanmoins, il est possible d'extrapoler à partir des données de la littérature, et d'estimer que le nombre annuel de décès dû à une anaphylaxie alimentaire en Europe est probablement supérieur à 200 [30]. L'anaphylaxie présente l'état maximal d'une réaction d'hypersensibilité immédiate de type I, Les symptômes sont graves avec risque vital. Les manifestations cliniques concernent plusieurs organes. Elles peuvent associer, à des degrés divers, des manifestations cutanées (prurit, flush, urticaire ou œdème des muqueuses), une dyspnée par bronchospasme ou

obstruction laryngée, une rhino-conjonctivite, une dysphonie, une atteinte gastro-intestinale (nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhée) et une atteinte cardio-vasculaire pouvant aboutir à un état de choc.

1-6 Différenciation entre allergie, intolérance et intoxication alimentaire

Les manifestations cliniques associées à l'allergie alimentaire ne sont pas spécifiques, particulièrement celles qui touchent l'appareil digestif. En effet certains aliments peuvent être à l'origine de plusieurs maladies, par intolérance ou par intoxication qui présentent des manifestations cliniques très proches de celles des allergies vraies. Cependant, d'un point de vue physiopathologique, il ne s'agit pas d'un mécanisme immuno-allergique.

1-6-1 L'intolérance

Elle implique toute réponse physiologique anormale, non immunologique, à un aliment ou à un additif alimentaire, médiée par un effet idiosyncrasique, pharmacologique ou métabolique. Elle est généralement le résultat d'un déficit enzymatique intestinal dont le plus répandu est un déficit enzymatique en lactase. L'intolérance en lactose peut être présente dès la naissance ou apparaître à des degrés divers au cours de l'enfance ou de l'adolescence. Le déficit congénital en lactase est rare. Chez l'adulte, la concentration intestinale en lactase a tendance à diminuer. En France, 60% des adultes conservent une activité lactasique et ne présentent donc aucune difficulté à digérer le lait. Le déficit en lactase est rarement total (des mesures de l'activité lactasique ont montré que 10% de son action persistait chez les personnes hypolactasiques). Les symptômes se traduisent par des vomissements, des crampes abdominales et des diarrhées dans les heures suivant l'ingestion du lait. Cette pathologie très répandue dans le monde, est à différencier de l'allergie aux protéines de lait de vache qui appartient à la catégorie des allergies alimentaires vraies.

L'intolérance au gluten ou maladie cœliaque, responsable d'une atrophie villositaire touche les populations caucasiennes, indiennes et moyennes orientales avec une prévalence de 0,5 à 0,3%. Les protéines du gluten - Gliadines - extraites du blé, de l'orge et du seigle, sont responsables de la réponse inflammatoire et auto-immune intestinale de la maladie cœliaque avec forte production d'anticorps anti-endomysium et anti-transglutaminase de type IgA. Cependant le(s) peptide(s) du gluten responsable(s) d'une telle réponse auto-immune menant à l'atrophie villositaire avec augmentation du nombre de lymphocytes intra épithéliaux T, CD8+, chez des sujets génétiquement prédisposés (HLA-DQ2 ou HLA-DQ 8 positif) n'ont pas été déterminés jusqu'à présent.

L'intolérance alimentaire à plusieurs additifs alimentaires a aussi été décrite, dont les colorants (tartrazine), des conservateurs (sulfites, nitrites, benzoates et parabens), des exhausteurs de goût (glutamate de sodium), et plusieurs autres moins bien étudiés. Chez certains sujets, ces produits peuvent induire de l'asthme, de l'urticaire et parfois des réactions anaphylactoïdes [31]. Le glutamate de sodium est responsable du syndrome du restaurant chinois, caractérisé par une sensation de brûlure, une douleur et un érythème facio-thoracique et une céphalée pulsatile, le tout débutant 20 minutes environ après l'ingestion.

1-6-2 Les intoxications alimentaires

Elles surviennent suite à la prise d'aliments contenant des substances naturelles pouvant entraîner un effet toxique direct.

Intoxication à l'histamine : Certains poissons, particulièrement le thon, le maquereau et la sardine, sont riches en histamine et peuvent entraîner une réaction anaphylactoïde dont la sévérité est proportionnelle à la quantité ingérée. D'autres aliments, principalement les crustacés, les fraises et parfois le chocolat, peuvent induire la libération d'histamine lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante.

Intoxication à d'autres amines vaso-actives : Certains champignons et baies sont reconnus toxiques. Certaines amines vaso-actives (épinéphrine, norépinéphrine, tyramine, dopamine, histamine) sont présentes dans les bananes, les tomates, les avocats, les ananas, les vins et les fromages. Les prunes, les concombres, les fèves et les oignons contiennent certaines substances susceptibles d'induire des troubles gastro-intestinaux par un effet irritant ou pharmacologique.

1-7 Epidémiologie générale des allergies alimentaires

L'épidémiologie de l'allergie alimentaire est moins connue que celle des autres symptômes de l'atopie, asthme, rhinites allergiques, eczéma qui ont bénéficié de grandes études multicentriques internationales. Elle est délicate en raison de la difficulté du diagnostique des allergies alimentaires et de la lourdeur de la méthodologie à mettre en œuvre pour les études épidémiologiques [32]. Malgré ces raisons et bien que l'on manque de données précises sur l'évolution de ces maladies, des éléments d'appréciation indirects (augmentation de l'atopie, signalement accru des accidents allergiques par les cliniciens) vont dans le sens d'un accroissement probable de cette pathologie dans les pays à haut niveau de vie. La prévalence de l'allergie alimentaire c'est à dire le nombre de cas enregistrés dans une

population donnée incluant les anciens et les nouveaux cas, n'a cessé de croître depuis 30 ans [33]. Bien qu'elle s'inscrive dans une dynamique évolutive des maladies atopiques, elle frappe par l'ampleur de son augmentation. Il semble que la prévalence de l'allergie alimentaire ait doublé aux cours des 10-15 dernières années. L'augmentation des fréquences constatée ces dernières années a débuté vers 1984 et s'est accrue considérablement à partir des années 1990. Elle laisse présager d'un nombre toujours plus élevé d'adolescents puis d'adultes allergiques. De plus, les formes graves que sont les chocs anaphylactiques, l'angio-œdème laryngé, l'asthme aigu se multiplient [33]. Leur augmentation d'un facteur 5 dans les vingt dernières années a été mise en évidence par Moneret-vautrin [34]. Les données du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologique en Allergie Alimentaire « CICBAA » établissent d'autre part que la prévalence relative des formes graves augmente avec l'âge, si bien qu'il n'est pas exagéré d'affirmer que l'allergie alimentaire est devenue un problème de santé public [35]. Au début des années 1990, deux grandes études ont permis d'estimer la prévalence cumulée de l'allergie alimentaire dans la population générale [36, 37].

L'enquête anglaise de young et al (1994), réalisée dans la population générale sur 20 000 personnes, à l'aide d'un questionnaire puis d'un entretien visant à obtenir la réalisation de tests de provocation oraux en double aveugle (TPODA) fournit un taux de prévalence de 1,4 à 1,8 % enfants et adultes confondus. L'enquête de Jansen et al (1994), effectuée en Hollande, à la même époque, donne des chiffres plus élevés entre 2 et 3%.

En France, la prévalence de l'allergie alimentaire a été estimée à 3,8% par Moneret-Vautrin (1998) à partir d'une enquête fondée sur des questionnaires totalisant 44 000 personnes avec un taux de réponses de 75% (soit 33 110) formant un échantillon représentatif au 1.10^{-3} de la population de 60 ans. Ce résultat a été définitivement confirmé par Kanny [38] qui a obtenu un chiffre moyen de 3,2% (de 3,04 à 3,44 %). D'autres auteurs (Suède, Finlande, Japon) cités par Kanny et al (2001) donnent des prévalences allant de 2,3 à 4,4% [39, 41].

Des études épidémiologiques récentes montrent que près de 4% des américains sont atteints d'allergie alimentaire, une prévalence très élevée par rapport à celle rapportée dans le passé [42]. Munoz-Furlong et al [43] ont estimé que 7 million d'américains présentaient des allergies alimentaires. De plus, la prévalence des allergies à l'arachide a doublé chez les enfants américains de moins de 5 ans durant les cinq dernières années [42].

1-7-1 L'épidémiologie varie en fonction des paramètres étudiés

L'âge : l'allergie alimentaire moins souvent impliquée chez les adultes que chez les enfants, est beaucoup plus fréquente chez ces derniers où la prévalence cumulée est estimée entre 4

Tous sujets n = 500		Adultes n= 440			Enfants n = 60		
Allergène	Nbr	Allergène	Nbr	(%)	Allergène	Nbr	(%)
Crabe	155	Crabe	141	32	Crabe	35	58
Arachide	150	Arachide	118	27	Arachide	32	53
Blé	136	Céleri	113	26	Céleri	30	50
Céleri	135	Blé	109	25	Blé	30	50
Persil	119	Persil	101	23	Peril	27	45
Soja	118	Soja	88	20	Soja	25	42
Oeuf (blanc)	108	Tomate	78	18	Tomate	22	37
Tomate	97	Œuf (blanc)	73	17	Œuf (blanc)	22	37
Pois	91	Orange	67	15	Orange	20	33
Orange	87	Pois	66	15	Pois	20	33
Noisette	85	Noisette	66	15	Noisette	20	33
Lait	85	Levure	60	14	Levure	20	33
Levure	80	P de terre	60	14	P de terre	19	32
P de terre	80	Carotte	60	14	Carotte	19	32
Porc	75	Oignon	59	13	Oignon	19	32
Oignon	74	Ail	57	13	Ail	18	30
Carotte	73	Seigle	57	13	Seigle	18	30
Ail	70	Crevette	56	13	Crevette	15	25
Riz	67	Lait	55	13	Lait	15	25
Seigle	67	Porc	53	12	Porc	14	23
Haricot blanc	66	Riz	49	11	Riz	14	23
Pomme	63	Pomme	49	11	Pomme	14	23
Crevette	59	Haricot bl	47	11	Haricot bl	13	22
Melon	55	Melon	44	10	Melon	13	22
Maïs	53	Maïs	43	10	Maïs	12	20
Poisson	52	Poisson	32	7	Poisson	11	18
Oeuf (jaune)	41	Amande	28	6	Amande	10	17
Kiwi	40	Œuf (jaune)	26	6	Œuf (jaune)	10	17
Amande	38	Kiwi	26	6	Kiwi	10	17
Moutarde	38	Moutarde	26	6	Moutarde	3	5

Tableau 4: Les sensibilisations les plus fréquentes chez 500 porteurs d'allergies alimentaires (André, 1992)

à 8,5% de la naissance à 8 ans [44]. Elle varie en fonction de l'âge. Elle est estimée à 4,19% de 1 à 3 ans, à 2,79% de 3 à 6 ans, à 2,8% de 7 à 15 ans, à 3,22% de 15 à 30 ans et à 3,97% de 31 à 60 ans [38].

Les allergènes : la fréquence des sensibilisations alimentaires n'est pas identique pour les différents allergènes. Le pouvoir allergisant varie selon les aliments (tableau 4). Ceux-ci sont différemment impliqués en fonction de l'âge, de la localisation géographique, des habitudes alimentaires et des allergies croisées.

- Chez l'enfant jusqu'à 15 ans, les allergènes responsables de 75% des allergies alimentaires sont l'œuf de poule, l'arachide, le lait de vache, les poissons, la moutarde et les noix. Jusqu'à 8 ans les allergènes alimentaires d'origine animale prédominent (53%) [45]. Les allergies alimentaires d'origine végétales demeurent majoritaires chez l'adolescent. L'alimentation de l'enfant étant exclusivement lactée dans les premiers mois de la vie, l'incidence de la sensibilisation aux protéines du lait de vache c'est à dire le nombre de cas de sensibilisation pendant une période donnée au sein d'un groupe d'enfant est de 50 % alors que pour une population d'adultes pendant la même période et sur le même site géographique elle est de 13%. Après 3 ans, l'arachide devient le principal allergène responsable d'allergie alimentaire, il se situe à la seconde place après l'œuf [46]

- Chez l'adulte, les allergènes alimentaires prépondérants sont d'origine végétale (fruits et légumes) dans 84 % des cas [45].

En France, les aliments les plus fréquemment mis en cause sont souvent consommés (tableau 4). Pour les populations d'enfants allergiques, l'œuf constitue le premier allergène (34% des cas) suivi de l'arachide (25%), du lait de vache (8%) puis du poisson (5%), de la moutarde et des noix [46]. Il existe une prépondérance des trophallergènes d'origine animale, de l'arachide et des fruits secs oléagineux (Source CICBAA). En ce qui concerne les adultes allergiques, les produits les plus souvent mis en cause sont les aliments appartenant à la famille du « groupe latex » (kiwis, bananes, avocats…) 14% des cas, les rosacées (pommes, poires, prunes) 13% des cas, sont les catégories d'aliments les plus citées (AFSSA, 2002).

Au Canada, l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) a identifié 9 aliments ou groupes d'aliments qui associés sont responsables de 90 % des réactions allergiques graves: les arachides, les noix, le sésame, le lait, les oeufs, le soya, le blé, le poisson, les crustacés et les mollusques.

Aux Etats-Unis, et dans les pays anglo-saxons (à l'exception de l'Australie), la prévalence des sensibilisations et des allergies à l'arachide est estimée entre 0,9 et 1,2% chez les enfants de la naissance jusqu'à l'âge de quatre ans [47, 48]. Une étude récente [49], faite sur des sujets allergiques à l'arachide et/ou aux noix d'arbres montre que 9% d'entre eux présentent une allergie isolée aux noix d'arbre, 23% une allergie associée à l'arachide et aux noix et 68% une allergie isolée à l'arachide. L'allergie à l'arachide devient l'allergie numéro 1 aux USA suivie par l'allergie aux fruits secs de type noix.

En Norvège, la prévalence cumulée de l'allergie aux protéines du lait de vache est estimée à 1,1% chez les enfants de la naissance jusqu'à l'âge de deux ans et demi [50]. Celle de l'allergie à l'œuf est évaluée entre 1,6 et 2,6% [51].

En Australie, à partir d'une étude [51] qui se déroule depuis 20 ans la prévalence cumulée de l'allergie au lait de vache est estime à 2%, Ce chiffre est comparable à celui qu'ont donné Halken et Host [52] pour les enfants Danois (2,2%). La prévalence des autres allergies alimentaires est de 3,2% pour l'œuf et de 1,9% pour l'arachide et de 0,42% pour les graines de sésame, chez les enfants âgés de deux ans. Pour les autres allergènes responsables d'allergie (sésame, noix du Brésil, amande) un classement a été établi.

- Ces résultats recueillis en fonction de l'âge et de la localisation géographique sont aussi liés aux habitudes alimentaires : arachide grillée/versus arachide bouilli.

La consommation de certains aliments est variable selon les pays. En Australie, pour des raisons culturelles, le sésame est couramment utilisé dans l'alimentation, aussi se trouve t-il au quatrième rang du classement devant les autres noix [51, 53]. Au Japon le riz, en Israël et en Espagne les fruits, dans les pays scandinaves et en Espagne le poisson, en Asie les fruits de mer et certains fruits tropicaux, occupent un rang privilégié dans les statistiques [32].

Les variations d'incidence des sensibilisations sont vraisemblablement dues à l'évolution des consommations. Une étude statistique faite par INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques) sur une période allant de 1984 à 1992 montre que durant la même période (tableau 4) l'augmentation de la fréquence (le nombre d'observations) de sensibilisation pour la moutarde, le riz, le soja est parallèle à l'augmentation de la consommation. La moutarde est reconnue comme un allergène précoce avant trois ans. Ceci est du probablement à l'existence de ce condiment dans les plats préparés pour les nourrissons [27]. La fréquence de sensibilisation est identique pour le porc et l'œuf dont la consommation reste stable. En revanche, une diminution de la consommation de pommes

de terre s'accompagne d'une diminution de la sensibilisation. La préparation des aliments peut jouer un rôle. La sensibilisation au blé s'accroît bien que la consommation du pain diminue, en raison vraisemblablement d'une augmentation de l'absorption de céréales. Enfin la sensibilisation au lait de vache diminue du fait de la diminution de la consommation de lait pur bien que la consommation de produits laitiers augmente.

Actuellement, le nombre d'allergies dites « émergentes », en augmentation de façon inquiétante, peut aussi être incriminé. Ceci pourrait s'expliquer par des changements de comportements alimentaires dans les pays développés, avec l'introduction « d'aliments émergents », dont les principaux sont : les épices (curry, paprika), les condiments (cayenne, carvi, coriande), les fruits exotiques (kiwi, avocat, litchis, noix exotiques), les graines de sésame, de psyllium, de tournesol et de lupin [54]. L'internationalisation et la diversification des repas, exposeraient certains individus à des réactions allergiques. Certaines allergies alimentaires s'expliquent aussi par l'existence d'allergies croisées [1]. Celles-ci peuvent concerner des aliments appartenant à une même famille botanique ou animale mais aussi à des aliments de familles différentes. Enfin, le développement des technologies agro-alimentaires peut aussi être mis en cause.

Le terrain atopique: L'atopie est incriminée dans 33 à 50% des dermatites atopiques de l'enfant, 2 à 8% des asthmes, 1 à 5 % des urticaires récidivantes ou chroniques, et plus de 10% des chocs anaphylactiques [55]. L'enquête de Kanny et al [38], confirme une prévalence des allergies alimentaires plus forte chez les atopiques que chez les non atopiques (57% versus 17% $P < 0,01$).

Les manifestations cliniques :

a) Asthme : Le rôle des allergènes alimentaires dans la maladie asthmatique est encore discuté, même si la possibilité pour l'allergène alimentaire d'induire un bronchospasme est connue depuis longtemps. On a particulièrement souligné sa survenue par l'inhalation de fumets de cuisson ou de particules liquides lors des préparations culinaires [56, 57]. La fréquence de l'allergie alimentaire au cours de l'asthme est très variable selon que l'on considère l'asthme uniquement lié à une allergie alimentaire ce qui est rare et l'asthme avec allergie(s) alimentaire(s) qui est beaucoup plus fréquent. La prévalence de l'asthme par allergie alimentaire se situe entre 2% tous âges confondus [58] et 10% chez l'enfant [59].

b) Anaphylaxies, chocs anaphylactiques et décès par anaphylaxie : Les principales causes de l'anaphylaxie sont les aliments, les venins d'hyménoptères, les médicaments et le latex.

Cependant, les dernières publications montrent que l'allergie alimentaire est devenue une cause d'anaphylaxie et de chocs anaphylactiques plus fréquente que par le passé [34]. Dans une étude pédiatrique menée par Novembre et son équipe [60] portant sur 95 épisodes d'anaphylaxie survenus chez 76 patients, les aliments viennent au premier plan avec 57% des cas, suivis par les piqûres d'hyménoptères (12%), les médicaments (11%), l'exercice (9,5%), les vaccins (2%), le latex (1%) et les accidents de l'immunothérapie spécifique (1%). Dans cette étude, les anaphylaxies idiopathiques représentent 6% des cas [60].

- Anaphylaxie et chocs anaphylactiques : Dans une étude menée par Pumphrey [61], portant sur 172 patients totalisant 700 épisodes d'anaphylaxie, tous âges confondus (5 mois à 69 ans), les aliments sont incriminés dans 60% des cas, la cacahuète étant en cause dans un cas sur quatre. Les autres causes d'anaphylaxie représentent 23,8% des cas. Les anaphylaxies idiopathiques comptent pour 16,2% des patients [61]. En France, l'enquête menée par le réseau d'allergo-vigillance [46], concernant les réactions anaphylactiques sévères montre que la fréquence des réactions sévères peut être estimée entre 15 000 et 30 000 par an. L'œdème laryngé était présent dans 51,5% des cas, le choc anaphylactique dans 39,9% et l'asthme aigu dans 8,6%. Cinquante trois pour cent des accidents sévères se sont produits chez l'adulte et 46,6% chez les enfants de moins de 15 ans. Parmi les allergènes incriminés les fruits secs oléagineux viennent en tête avec 27,6% des cas (les noix divers 9,2% et l'arachide 18,4%), l'arachide étant la cause majeure des accidents chez les enfants de moins de 15 ans. Au second rang se trouvent les fruits ou les aliments qui croisent avec le latex ; 11,6% des cas (76% des sujets concernés sont déjà sensibilisés au latex). Les allergènes les plus fréquents sont l'œuf 8,6% des cas, le poisson 6,7% et le sésame 4,3%. Désormais, les aliments viennent au premier rang des causes de l'anaphylaxie et des chocs anaphylactiques. Ces données, légitiment des mesures de prévention bien codifiées [62] et une surveillance étroite au titre de l'allergovigilance [46, 63].

- Décès par anaphylaxie aiguë : Les aliments sont la cause de 25% des décès par anaphylaxie aiguë, tous âges confondus. Les autres cas sont secondaires à des facteurs iatrogènes (50%) ou à des piqûres d'hyménoptères (25%) [64]. Dans l'étude de Bock [30] qui concerne uniquement les décès par anaphylaxie alimentaire, l'arachide est incriminée dans 63% des cas, suivie par les noix d'arbre (31%) et, très accessoirement, par le poisson et le lait de vache (seulement en cause dans 2 cas sur 31). Les adolescents et les adultes jeunes sont les principales victimes : parmi 32 décès par allergie alimentaire, 17 patients étaient âgés de

moins de 18 ans. Un asthme, instable ou mal équilibré est associé aux décès par allergie alimentaire dans 80% des cas ou même davantage [30, 64]. En admettant que 5% des enfants soient atteints d'allergie alimentaire, MacDougall et al [65] ont estimé que le risque annuel de décès par allergie alimentaire était de 1 p. 800 000.

1-7-2 Les facteurs de risques

Véritable problème de santé publique, les allergies alimentaires peuvent être graves, voire mortelles. Leur augmentation est patente dans la population adulte et particulièrement chez les enfants. Les facteurs de risques associés au développement des allergies alimentaires sont néanmoins multiples, et peuvent se diviser en facteurs spécifiques à l'individu et en facteurs liés à l'environnement.

1-7-2-1 Les facteurs liés à l'individu

Facteur génétique : Les études de la transmission des parents aux enfants montrent que, pour un enfant, le risque d'être atopique est respectivement de l'ordre de 9 à 18%, 25 à 40%, et 50 à 70% lorsque aucun, un seul ou les deux parents sont allergiques [66].

Sexe : Il semble que les garçons montrent un risque d'atopie plus élevé envers les acariens, le pollen de graminées, l'allergène de l'épithélium du chat, ainsi que pour le développement de l'asthme. L'allergie alimentaire apparaît dans les trois quarts des cas avant l'âge de 15 ans. Elle est plus fréquente chez les garçons, avec un sexe ratio de 1,7/1 garçons/filles [67], proportion également rencontrée pour les autres manifestations allergiques chez l'enfant. L'allergie au lait de vache chez l'enfant semble toucher les deux sexes, et à l'opposé, chez l'adulte, elle concerne essentiellement les femmes (91,2% dans l'étude de [68]). Chez l'adulte, des taux plus élevés d'IgE totales et spécifiques de différents allergènes ont été mesurés chez l'homme [69].

Age : Les allergies alimentaires apparaissent au début de la vie, notamment chez les enfants ayant un terrain atopique. En générale, les taux d'IgE sont très élevés dans l'enfance et diminuent rapidement entre 10 et 30 ans [70]. Ainsi, les allergies alimentaires présentent une prévalence très élevée avant l'âge de deux ans. Dans le cas de l'allergie au lait de vache, l'administration précoce de cet aliment, conduit à une sensibilisation durable et à de forts risques de développement d'une allergie alimentaire chez les enfants atopiques [71]. Ceci est du au fait que l'antigène est administré à un enfant dont la barrière intestinale n'est pas mature, et dont le système immunitaire est essentiellement orienté vers une réponse de type Th2. La perméabilité intestinale est à son maximum pendant les 3 à 4 jours après la

naissance, puis diminue avec l'âge, aussi bien chez les enfants atopiques que les non atopiques [72].

1-7-2-2 Les facteurs liés à l'environnement

Exposition aux allergènes : Les enfants exposés très tôt aux allergènes comme c'est le cas pour le lait de vache mais aussi pour la moutarde contenue dans les petits pots et les plats préparés pour les nourrissons et utilisés avant 3 ans ainsi que le poisson et les fruits de mer dans certaines contrées, présentent plus de risques de développer des allergies alimentaires et de l'asthme.

Pollution et tabagisme passif : La pollution et le tabagisme passif sont des facteurs aggravant le phénomène allergique. Ils agissent comme des adjuvants de la réponse allergique [70]. La pollution a des effets directs sur les cellules B via les hydrocarbures aromatiques, conduisant à une augmentation de la réponse IgE. Le tabagisme passif quant à lui augmente la prévalence d'une respiration asthmatique chez l'enfant [52], et conduit à une augmentation des concentrations d'IgE totales chez l'adulte [70].

Alimentation : L'alimentation joue un rôle primordial dans le développement correct du système immunitaire. En effet, une alimentation inadaptée, aboutit à une détérioration du système immunitaire. Le lait maternel apparaît en effet comme l'aliment idéal pour les nourrissons car il est parfaitement adapté à sa physiologie. Il apporte quantitativement et qualitativement tous les nutriments nécessaires pour le développement des nouveaux nés sans risque de carence ni de surcharge [73]. Bien qu'il existe dans le lait maternel des allergènes alimentaires, il contient également des facteurs de croissance qui facilitent la maturation de la muqueuse intestinale et des anticorps IgA sécrétoires qui contribuent à diminuer la présence de ces allergènes dans le lait maternel. Il semble que l'effet protecteur du lait soit réel mais transitoire jusqu'à 18 mois. A 2 ans seulement et dans certains cas exceptionnels, des quantités infimes d'allergènes présents dans le lait peuvent déclencher une sensibilisation [73]. Le passage possible des allergènes dans le lait maternel ne remettrait pas en cause son effet protecteur. L'exposition précoce des nourrissons à une plus grande variété d'allergènes est un facteur supplémentaire à prendre en considération pour expliquer l'augmentation de la prévalence des allergies alimentaires en France et ailleurs dans le monde.

Infection : Lors d'une infection virale, le taux des IgE est augmenté chez l'enfant et chez l'adulte. En revanche, les infections bactériennes, peuvent prévenir une sensibilisation

allergique. En parallèle, les réactions atopiques sont beaucoup plus fréquentes dans les pays développés que dans les pays en voie de développement où la prévalence des infections bactériennes est plus importante. Différentes observations, tant chez l'homme que chez les modèles animaux [74, 75] semblent montrer que la réduction des infections bactériennes peut contribuer à l'augmentation de la sévérité et de la prévalence des atopies chez l'homme, en modifiant l'équilibre de la balance Th1/Th2.

Hygiène : L'amélioration de l'hygiène dans les sociétés des pays développés peut conduire l'évolution du système immunitaire de l'enfant vers un profil de type Th2 associé à des réactions immunitaires IgE dépendantes. Le développement récent des allergies alimentaires pourrait être ainsi lié à la baisse des infections intestinales chez l'enfant qui empêcherait le système immunitaire de s'orienter vers des réponses cellulaires de type Th1, moins impliquées dans les réactions allergiques [76].

1-7-3 Les principaux allergènes alimentaires

Les antigènes alimentaires ou trophallergènes sont classés en deux groupes en fonction de leur provenance (végétale ou animale).

1-7-3-1 Les principaux allergènes d'origine végétale

L'arachide

L'arachide est une légumineuse annuelle originaire de Brésil, mais l'Inde en est le principal producteur. Elle est cultivée pour son fruit, une gousse connue sous le nom de cacahuète. Ces graines renferment de 35 à 55% de matière grasse et sont utilisées en tant qu'ingrédient nutritionnel, complément protéique ou améliorant des caractéristiques fonctionnelles des aliments. L'obtention d'un produit de texture définie avec un goût résiduel de cacahuète, plus au moins prononcé, en fait toute sa dangerosité car c'est un allergène masqué, qui peut être intégré à n'importe quel préparation culinaire, pharmaceutique ou cosmétique [27, 55, 77, 80]. L'allergie à l'arachide est un véritable problème de santé publique dans certains pays en raison de sa fréquence, de la sévérité des manifestations cliniques et de sa persistance. L'allergie à l'arachide constitue la principale cause des réactions anaphylactiques [81]. La prévalence de l'allergie à l'arachide varie entre 0,5 et 1,1% [48, 82] mais elle dépend de la population étudiée. Les allergies alimentaires à l'arachide sont de plus en plus fréquentes.

Aux Etats-Unis et dans plusieurs pays d'Europe de l'Ouest la prévalence cumulée de l'allergie à l'arachide est de 0,5 à 1,2% chez l'enfant [48, 82]. En France, l'allergie à l'arachide occupe la deuxième place derrière l'œuf dans les allergies alimentaires de l'enfant de moins

de 3 ans [27, 79]. La prévalence des allergies alimentaires chez l'adulte est censément moins commune, mais un aperçu récent aux USA a constaté que 1,3% des adultes sont allergiques aux arachides [83].

Les allergènes se déclinent de Ara h 1 à Ara h 5 ; Ara h 1 (63.5 kDa), Ara h 2 (17 kDa) et Ara h 3 (14 kDa) sont considérés comme les allergènes majeurs et plus de 95% de patients allergiques à l'arachide sont sensibles à Ara h 1 et Ara h 2 [84-87]. Ces derniers, sont thermostables et résistent à l'hydrolyse enzymatique notamment lors de la digestion.

La fréquence de l'allergie à l'arachide est bien plus forte dans les pays occidentaux, notamment aux Etats-Unis, que dans les pays d'Extrême-Orient, particulièrement en Chine. Cette différence ne s'explique pas seulement par l'importance de l'arachide dans l'alimentation ou par la nature des variétés consommées, les habitudes alimentaires et les modes de consommation peuvent aussi intervenir. En effet, il a été montré que le fait de griller, les arachides pouvaient augmenter leurs propriétés allergéniques, notamment leur capacité de liaison aux IgE spécifiques par comparaison aux arachides crues [88]. A l'inverse, l'allergénicité des arachides bouillies ou frites, telles qu'elles sont consommées traditionnellement en Chine, serait diminuée [89]. 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 cuisson traditionnelle. Toutefois, les études publiées montrent des résultats parfois divergents. Un traitement à très hautes températures aboutit à des réactions de brunissement (réactions enzymatiques de Maillard). Un sucre réducteur est un acide aminé donnant un composé qui se transforme en glycosyl amine N substitué. Cette particularité conduit à la stabilité de la structure et à l'augmentation de l'allergénicité de l'arachide. Selon Maleki et al (2000) la capacité de liaison aux IgE est 90 fois plus importante pour l'arachide grillée que pour la forme crue. A l'inverse, Burks et al (1992) n'obtiennent aucune modification de la capacité de liaison aux IgE et aux IgG spécifiques lorsque l'arachide est soumise à différents traitements thermiques. En accord avec cette dernière étude, les résultats de Mondoulet [90] ne permettent pas de montrer de différence significative d'allergénicité entre l'arachide grillée et l'arachide crue. Par opposition à ce que l'on observe lors du traitement thermique par voie sèche, la cuisson de l'arachide par ébullition entraîne une forte diminution d'allergénicité. Leurs résultats soulignent que les effets des procédés technologiques sur l'allergénicité des aliments sont très complexes et dépendent de l'interaction de nombreux

paramètres comme la température, la cinétique de chauffage, les caractéristiques physico-chimiques du milieu. La matrice alimentaires intervient également, et notamment la composition en protéines, elle même variable en fonction de la variété d'arachide des conditions de culture, de stockage… la baisse d'immunoréactivité des arachides bouillies, associée à une spécificité des IgE de patients allergiques contre de nombreuses protéines solubilisées dans l'eau de cuisson, semble avoir un impact sur la prévalence de l'allergie à l'arachide dans les populations pour lesquelles ce mode de consommation est traditionnel.

Les voies de sensibilisation sont l'ingestion, le contact et l'inhalation. Plusieurs études ont suggéré que l'atopie, les antécédents familiaux d'allergie à l'arachide [91, 92], la consommation de cacahuètes par la mère pendant la grossesse et/ou l'allaitement [91], le lait infantile contenant de l'huile d'arachide, des vitamines en solution huileuse [55, 77, 80], pourraient entraîner une sensibilisation à l'arachide. Les allergies à l'arachide apparaissent plus tard que les autres, ce qui correspond à l'introduction des biscuits apéritifs dans l'alimentation des enfants, vers l'âge d'un an. Pour Bock et Atkins, l'âge moyen de l'allergie à l'arachide était de 3 ans, en 1989. Pour Dutau et Rancé 53% des enfants allergiques à l'arachide sont âgés de moins de 3 ans.

Le lupin

Le lupin est une légumineuse du genre *Lupinus* de la sous famille des Papilionacées qui comporte 450 espèces. Il est cultivé depuis plus de 4 000 ans, c'est un proche parent du pois, de la fève, du soja et du haricot. Aujourd'hui quatre espèces ont un intérêt agronomique : le lupin blanc (*Lupinus albinus*) dans les pays méditerranéens, le lupin bleu (*Lupinus angustifolius*) en Australie, le lupin jaune (*Lupinus luteus*) en Europe centrale, le lupin sud-américain (*Lupinus mutabilis*) [93]. La farine de lupin est une excellente source protéique variant de 39 à 45% selon les espèces. Elle contient des acides aminés essentiels (lysine, leucine et thréonine). Elle est également une source intéressante d'acides gras mono-insaturés [94]. L'inclusion de la farine de lupin blanc dans la farine de blé a été proposée récemment en alimentation humaine. L'addition de farine de lupin intéresse les produits céréaliers : elle limite la rétraction des biscuits après cuisson, améliore le moelleux et la conservation, ainsi que la couleur grâce à sa teinte jaune. Des concentrés sont à l'étude pour leurs propriétés émulsifiantes destinées aux industries de la viande et de la charcuterie. Elle est également utilisée dans l'élaboration de plats végétariens. Son utilisation reste encore

restreinte dans l'alimentation française. Enfin, le lupin ne contient pas de gluten et pourrait être utilisé dans les aliments sans gluten [95].

A ce jour les cas rapportés sur l'allergie au lupin concernent des réactions de type urticaire, un syndrome oral [96, 97] et de réaction anaphylactique sévère [98]. Kanny, rapporte le premier cas d'asthme aigu grave à la farine de lupin. La dose réactogène est faible (965 mg) et pourrait être contenue dans 100 g de pain, ce qui souligne le haut risque allergique de l'utilisation de farine de lupin en boulangerie sans étiquetage pour les patients allergiques à l'arachide. La patiente, dont la maladie asthmatique est bien maîtrisée par le régime d'éviction de l'arachide, court un nouveau risque en mangeant des produits non étiquetés. La réactivité croisée entre lupin et arachide évaluée par prick-tests par Helf et al. concerne cinq patients sur sept [96]. Dans l'étude de Kanny, elle est évaluée à 44% (11 patients sur 24). Les manifestations cliniques liées à une réactivité croisée entre légumineuses sont évaluées à 5% des cas [99]. Le lupin se singularise donc par la fréquence des réactions croisées avec l'arachide. Les allergènes du lupin sont multiples et composés d'isoformes. L'étude par inhibition de l'immunoblot de farine de lupin par l'arachide montre que la réactivité croisée concerne des protéines de 43-45, 58 et 65 kDa. La protéine de 43-45 kDa pourrait correspondre à l'allergène majeur [100]. D'après Moneret-vautrin et al, le risque de l'allergie au lupin serait élevé, car le test de provocation orale est positif à moins d'un gramme chaque fois que le prick-test est positif. Cependant, un prick test négatif n'élimine pas formellement le diagnostic d'allergie alimentaire au lupin, l'ingestion pouvant déclencher des symptômes même en l'absence de réactivité cutanée à l'allergène [35].

Les noix : Comme l'arachide, les noix peuvent constituer des allergènes masqués dans de nombreux produits agroalimentaires où elles sont utilisées comme arômes notamment dans le chocolat.

Les noisettes : L'allergie à la noisette est aussi fréquemment rencontrée.

Le sésame : L'allergie au sésame est très fréquente en Australie, elle émerge progressivement et rapidement en Europe depuis 3 ans. En France, elle reste encore rare chez l'enfant (0,6%), mais touche désormais 4,4% des adultes [44].

Le Soja : Plante de la famille des légumineuses. Comme l'arachide et les noix, l'allergie au soja s'est développée dernièrement avec son utilisation sous forme d'ingrédient alimentaire dans les produits industriels de nature très diverse.

Les fruits : Parmi les fruits, l'allergie à l'orange est fréquente, la manipulation des agrumes pouvant entraîner de l'eczéma des mains. Les rosacées, qui regroupent des fruits de consommation courante comme la pêche, la prune, l'abricot, la cerise, l'amande, la pomme, la poire, la framboise, la fraise sont souvent incriminées. Elles représentent la cause la plus fréquente d'allergie alimentaire chez l'adulte en France [101]. Néanmoins chez l'enfant, peu de cas sont rapportés [44, 101]. Cette allergie débute tardivement car, classiquement en Europe du Nord, la sensibilisation aux rosacées nécessite la sensibilisation préalable au pollen de bouleau (syndrome pomme-bouleau). En Italie et en Espagne, la prévalence de l'allergie aux rosacées chez l'enfant est beaucoup plus élevée [102]. Les rosacées dont la pomme sont souvent incriminées. Une remarque à propos des allergènes de la pomme : ils sont fragiles et disparaissent du jus en quelques heures. Depuis quelques années on voit de nouvelles allergies apparaîtrent à la banane, au kiwi, à l'ananas, à la mangue, à l'avocat et à la châtaigne (groupe de fruits donnant des réactions croisées avec le latex).

Les céréales : Les céréales en particulier le blé, ont été utilisées depuis les temps les plus anciens. Sous le terme de céréales, on regroupe par commodité des graminées (avoine, blé, maïs, millet, orge, riz, seigle, sorgho, etc.) et le sarrasin [98]. Une quarantaine d'antigène ont été individualisés dont la moitié est commune au blé et à l'orge. D'autres ont été isolés à partir du riz.

Moutarde : Peut être responsable de choc anaphylactique. C'est un cas typique d'allergie masquée (plats préparés industriellement, sauces de restaurant).

1-7-3-2 Les principaux allergènes d'origine animale

Le poisson

Le poisson est également un aliment à fort potentiel allergisant, en particulier les poissons de mer. Il existe souvent une allergénicité croisée entre les différentes familles. L'activité allergénique siège dans les constituants sarcoplasmiques qui représentent 20 à 30% du tissu musculaire. Elle est retrouvée dans les molécules volatiles (allergènes aéroportés): odeur de poisson ou vapeur de cuisson. Elle résiste totalement au chauffage. Par ailleurs, certains poissons comme le thon sont riches en histamine et peuvent provoquer ce qu'on appelle une fausse allergie. En France, l'allergie au poisson se situe au troisième rang après l'œuf et l'arachide. Elle représente 13% des allergies alimentaires de l'enfant et 7,4% des allergies alimentaires de l'adulte. Cependant, cette prévalence pourrait bien augmenter avec l'incorporation croissante de poisson dans les produits alimentaires industriels. L'allergie au

poisson est plus courante, dans les pays côtiers, tels que le Japon, l'Espagne et la Scandinavie, où de grandes quantités de poissons sont quotidiennement consommées [103].

L'allergène majeur responsable de l'allergie au poisson, au moins au Japon, est une protéine cytoplasmique liée au calcium, de type parvalbumine et de poids moléculaire 12 kDa, appelée Gad c1 [104, 105]. Elle a été retrouvée chez plusieurs espèces de poissons tels que le cabillaud [106], le saumon d'Atlantique [107], la carpe [108], et le chinchard japonais [109]. Chez des patients allergiques aux poissons, des IgE spécifiques à la gélatine de poisson (collagène) ont aussi été mis en évidence. De plus, une étude réalisée par une équipe japonaise a identifié un allergène de haut poids moléculaire chez le thon. Cinq fractions protéiques préparées à partir du muscle du thon et analysées par la technique ELISA ont montré que l'allergène de haut poids moléculaire se trouvait dans la fraction protéique [110]. A partir des tests de SDS-PAGE, immunoblot et analyse d'acides aminés de cette fraction, il a montré que cet allergène de haut poids moléculaire reconnu par le sérum de plusieurs patients était le collagène [103].

L'œuf : L'allergie à l'œuf de poule est la principale allergie alimentaire chez l'enfant âgé de moins de trois ans [44, 50]. Cette allergie disparaît avec l'âge, cependant, dans certains cas, elle peut durer toute la vie. Cette allergie peut être responsable de réactions sévères. Les manifestations allergiques à l'œuf peuvent être cutanées (urticaire, eczéma), respiratoires (asthme), voire systémiques (anaphylaxie). C'est principalement dans le blanc d'œuf que se trouvent les allergènes : ovalbumine (58%), ovomucoïde (11%), conalbumine (14%), lysozyme (3,4%). Le jaune d'œuf paraît beaucoup moins allergisant. Plus que n'importe quel autre allergène, l'œuf est très présent dans les produits alimentaires industriels en tant qu'ingrédient ou additif (conservateur, liant, émulsifiant, coagulant).

Le lait de vache : Le lait est constitué en majorité d'eau (90%). La matière sèche comprend des glucides, principalement sous forme de lactose, de la matière grasse en émulsion, de la matière azotée (protéines et azote non protéique) et des sels minéraux. Les protéines du lait de vache se répartissent en deux groupes : les caséines (80%) et le lactosérum (20%) (α-lactalbumine, β-lactoglobuline, sérumalbumine, lactoferrine). Les réactions allergiques sont principalement observées à l'égard de l'β-lactoglobuline et de l'α-lactalbumine [111]. L'allergie aux protéines du lait de vache se caractérise par sa prévalence élevée puisque l'on estime qu'elle atteint 2 à 3% des nourrissons dans la population générale [112]. Elle correspond à la quatrième allergie alimentaire chez l'enfant, derrière l'œuf, l'arachide et le

poisson [27]. Dans l'allergie au lait de vache, les symptômes apparaissent précocement, le plus souvent avant l'âge de 6 mois. Les manifestations cliniques sont essentiellement cutanées (urticaire, eczéma). Elles peuvent être digestives (vomissements, diarrhées, reflux gastro-oesophagien) et respiratoires (toux, asthme) [113]. De plus, on notera que les protéines du lait sont de plus en plus fréquentes en tant qu'ingrédient alimentaire dans des produits variés. C'est pourquoi un étiquetage clair et précis est indispensable pour les personnes sensibles.

Les crustacés : Crevettes, crabes, araignées de mer, homard, tourteaux, langoustes, langoustines, écrevisses contiennent tous des trophallergènes puissants. Les crustacées sont présentes dans de nombreux plats préparés (restaurants, cantines). Il s'agit le plus souvent de crevettes qui jouent le rôle d'allergène masqué.

Les mollusques : Escargots, huîtres, moules …

Les viandes : L'allergie à la viande de cheval a été décrite par Richet, chez les sujets sensibilisés par injection de sérum antidiphtérique. La sensibilisation à la viande de porc est la plus fréquente. On notera de rares sensibilisations au bœuf pour lequel il peut exister une allergie croisée au lait de vache (bœuf peu cuit) ainsi qu'au poulet. Dans ce dernier cas, il existe aussi une allergie croisée à l'œuf.

1-8 Natures des allergènes alimentaires

1-8-1 Généralités

Les aliments allergéniques sont des aliments sains, de bonne valeur nutritionnelle couramment consommés par l'ensemble de la population sans entraîner le moindre effet secondaire. L'allergénicité d'un aliment est complexe et généralement due à plusieurs constituants. Il en résulte une grande quantité d'allergènes pouvant être reconnus par les IgE spécifiques d'un individu sensibilisé. Selon la fréquence de la reconnaissance on définira comme allergène majeur, l'allergène réagissant avec les IgE spécifiques de 50% des patients sensibilisés par opposition à un allergène mineur (moins de 50% des IgE spécifiques). Les allergènes alimentaires sont en majorité des protéines résistantes à la température, à la protéolyse et à des conditions de pH modérément acide. Leur masse moléculaire est comprise entre 10 et 70 kDa. La plupart des allergènes végétaux sont des glycoprotéines fonctionnellement indispensables et relativement bien conservées au cours de l'évolution.

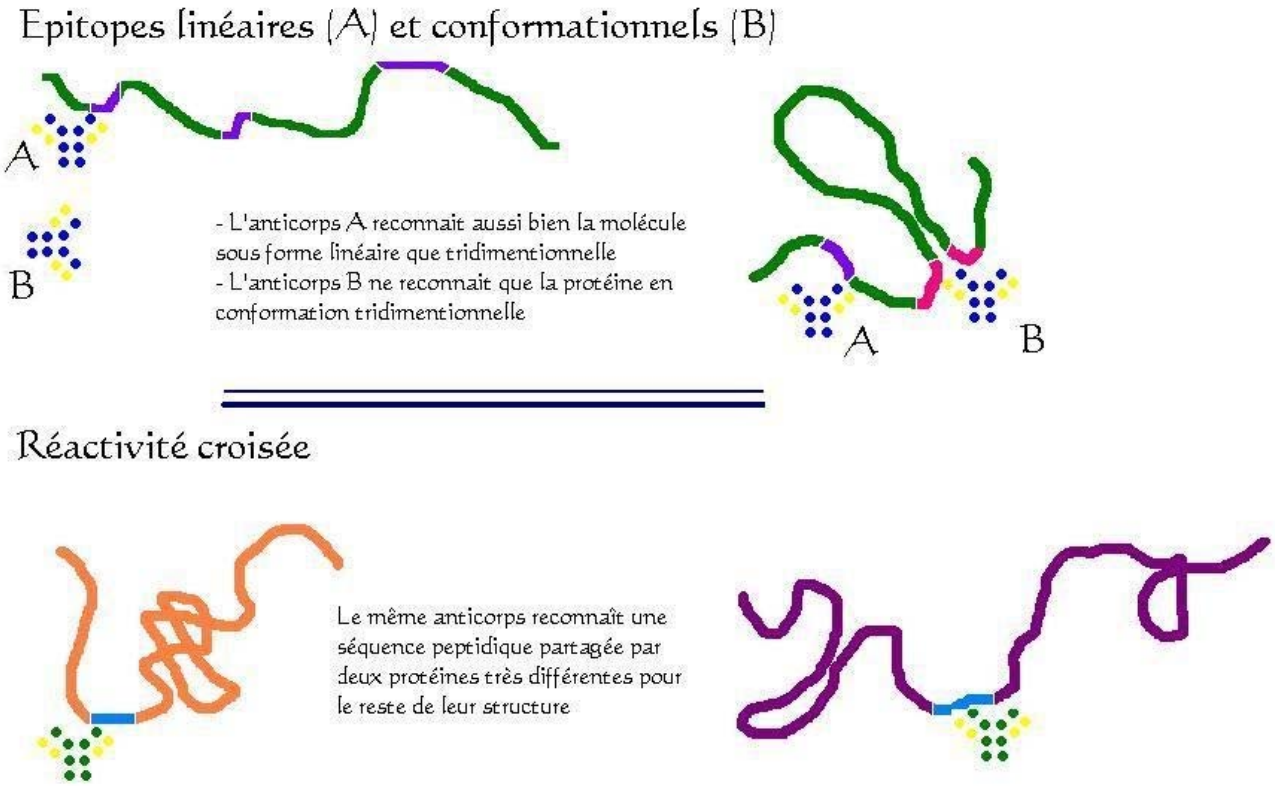

Figure 5 : Schéma des épitopes linéaires et conformationnels

Les allergènes sont souvent des constituants importants de l'aliment par leur masse ou leur concentration. Cependant, certaines protéines telles que les protéines du lait sont reconnues à l'état de traces par un grand nombre de malades allergiques au lait chez qui elles provoquent des manifestations cliniques graves. Il n'y a pas de lien étroit entre les propriétés biologiques d'une protéine et son caractère allergénique éventuel. Cependant, de nombreux allergènes se trouvent dans des familles moléculaires telles que les albumines 2S, les albumines sériques, les inhibiteurs trypsiques du soja, les protéines PR (pathogenesis related), les phospholipases A qui sont respectivement des protéines de réserve, de transport de métabolites, de protection des graines et de réserve, de défense et des enzymes de dégradation des phospholipides. Ces protéines ont des fonctions physiologiques ou métaboliques importantes pour les végétaux et les animaux et sont associées à des structures très conservées au cours de l'évolution et qui se retrouvent de manière quasi ubiquitaire.

1-8-2 Structure des allergènes

a) Les épitopes

Les protéines allergéniques ont une structure 3D caractéristique de l'allergénicité. Au niveau moléculaire, elles sont constituées d'une multitude de structures antigéniques immunoréactives, les épitopes, largement réparties sur toute la molécule et susceptibles de réagir avec les acteurs du système immunitaires : immunoglobulines, lymphocytes B et T. Cependant, il n'y a pas de région ou de structure spécifique qui serait responsable de l'allergénicité. Les épitopes sont hétérogènes. Il existe des épitopes immuno-dominants qui réagissent avec 50% des patients sensibilisés. La sensibilisation aux divers épitopes d'un allergène diffère d'un individu à l'autre et la diversité des récepteurs IgE des patients est très grande.

b) Nature des épitopes : La plupart des épitopes sont de nature peptidique et se répartissent en deux groupes :

- Les épitopes discontinus et conformationnels et les épitopes continus ou séquentiels appelés épitopes linéaires (figure 5).

- Les épitopes conformationnels sont liés à la structure de la protéine dans son état natif c'est à dire en 3D. Ces structures tridimensionnelles, responsables de l'allergénicité sont formées par le rapprochement d'acides aminés éloignés et sont responsables de l'activation

des lymphocytes B. Les IgE spécifiques des isotopes discontinus ont une plus forte affinité que les IgE spécifiques des épitopes continus [114].

Les épitopes linéaires sont constitués de séquences peptidiques de 5 à 10 acides aminés le long de la séquence primaire. L'immunoréactivité de ces épitopes est due au seul enchaînement des résidus d'acides aminés. Ils activent les lymphocytes T. Certains épitopes concernent aussi des molécules liées à l'allergène, les déterminants carbohydrates (CCD : carbohydrate cross-reacting determinants). Les CCD sont des chaînes glucidiques (glycanes) portées par des glycoprotéines. Les CCD sont immunogènes.

c) Les haptènes

Ce sont généralement des substances de faible poids moléculaire, incapables de susciter par elles mêmes la réaction immunitaire, mais pouvant devenir immunogènes et acquérir les propriétés d'un véritable antigène grâce aux molécules porteuses (couplage avec une protéine qui leur sert de support, ou par adsorption à la surface de particules en suspension). Dans ces conditions, l'haptène devient souvent le déterminant antigénique dominant de la molécule. S'il est incapable d'induire la formation des anticorps, il peut toutefois réagir avec eux et déclencher des réactions allergiques.

1-9 Allergies croisées et réactivités croisées

Le phénomène d'allergie croisée a été observé pour la première fois par Eriksson en 1978. Il a constaté que les allergies alimentaires aux fruits et légumes étaient deux à trois fois plus fréquentes chez les patients souffrants d'allergies polliniques. Plusieurs syndromes, mettant essentiellement en relation des pollens et des fruits ou différents aliments d'origine animale, ont été décrits.

1-9-1 Allergies croisées

a) Définition

Les allergies croisées, correspondent à des manifestations cliniques allergiques dues à des allergènes différents de ceux responsables du premier contact sensibilisant. Elles concernent généralement des allergènes alimentaires appartenant à une même famille soit botanique soit animale. La réactivité croisée des IgE vis à vis de ces allergènes reflète alors la relation phylogénétique entre les organismes. Cette relation aboutit à un haut degré d'homologie dans la structure primaire des protéines (la séquence d'acides aminés). La forte homologie dans la séquence primaire aboutit à des structures tridimensionnelles homologues et

potentiellement à la réactivité croisée [115]. Cependant, un certain nombre d'allergies croisées sont dues à des allergènes provenant de sources différentes, par exemple aliments et pneumallergènes (pollens). Dans ces cas les protéines sensibilisantes ont une grande homologie de structure.

La liste suivante des allergies croisées n'est pas exhaustive mais on peut citer :

Les allergies croisées dues à des allergènes provenant d'une même famille végétale :

- les crucifères entre elles : la moutarde, le cresson et le radis
- les céréales entre elles ; le blé, le seigle, l'orge et l'avoine
- les légumineuses entre elles : l'arachide, le petit pois, le haricot, le soja et la lentille.
- les liliacées entre elles : l'ail, l'oignon, l'asperge et la ciboulette
- les ombellifères entre elles : le céleri, la carotte, le persil, le coriandre, l'aneth, le fenouil et le cumin
- les rosacées entre elles : l'abricot, la pomme, la poire, la pêche et la prune.
- les solanacées entre elles : la tomate, la pomme de terre, l'aubergine et le café vert

Les allergies croisées dues à des allergènes provenant de sources différentes :

- La pomme et les pollens de bouleau, d'aulne ou de noisetier
- Les céréales et les graminées
- L'escargot et les acariens de la poussière de maison
- L'avocat, la banane, la châtaigne, le kiwi, la tomate et la pomme de terre avec le latex.
- La levure de bière et de boulanger avec candida albicans
- Le jaune d'œuf, plus que le blanc d'œuf, avec la chair et la plume de poulet
- Les ombellifères avec les herbacées, armoise et ambroisie
- Le lait de vache et le bœuf (peu cuit)
- La morue, le thon et le saumon
- L'huître et la moule
- Le crabe et la crevette

Les allergènes croisants peuvent être classés en 3 catégories :

- Les allergènes croisants caractérisés par une même fonction.

Les allergènes croisants peuvent avoir des fonctions très voisines correspondant à des structures proches. Ces fonctions permettent de rapprocher des allergènes apparemment très différents. Parmi les fonctions biologiques les plus importantes reconnues à ces allergènes, on trouve des activités enzymatiques (cystéines protéases, glutathion transferase),

des fonctions de protéines de transport (albumines), des fonctions de protéines régulatrices (profilines).

- Les allergènes croisants sont définis par leur forte homologie de structure.

Ce sont des protéines ayant un degré d'homologie plus ou moins élevé correspondant à une plus ou moins grande concordance entre les acides aminés (structure primaire). Parmi eux l'allergène majeur du bouleau Bet v1 a 56 % d'homologie avec l'allergène majeur de la pomme Mad d1.

- Les déterminants carbohydrate (CCD : carbohydrate cross reactive determinant).

Ce sont des chaînes glucidiques portées par des glycoprotéines. Les CCD sont immunogènes et les allergènes sont généralement des glycoprotéines. Les réactions croisées dues aux CCD sont fréquentes.

1-9-2 Réactivité croisée

La réactivité croisée entre pollens, fruits et légumes a été décrite depuis longtemps [116, 117]. De nombreuses publications sont venues renforcer ces premières observations [118-122]. La fréquence des allergies alimentaires aux végétaux est significativement liée à la sensibilisation pollinique contrairement à ce qui est constaté pour les allergies alimentaires aux produits d'origine animale [123]. La sensibilisation pollinique est retrouvée dans 100% des cas d'allergie aux ombellifères, dans 83% des cas d'allergies aux rosacées, dans 50% des cas d'allergies au latex, dans 37% des cas d'allergie aux arachides. On notera qu'elle n'est présente que dans 16,5% des cas d'allergies aux produits d'origine animale.

La fréquence d'homologie de structure entre des protéines de pollens et de fruits et légumes explique les résultats positifs des tests biologiques dus aux réactions croisées *in vitro*. Les déterminants carbohydrates (CCD) induisent fréquemment des réactions croisées *in vitro*, ainsi qu'il a été rapporté dans le cas du latex et des venins d'hyménoptères [124]. *In vivo* les CCD n'ont cependant aucune incidence clinique.

Une réaction croisée correspond à la reconnaissance, par un même anticorps, d'un épitope commun à deux molécules. Cela implique un certain degré d'homologie entre ces deux molécules, dans notre cas les allergènes. Cet épitope commun peut être supporté par deux molécules apparentées (structures et fonctions semblables) ou moins fréquemment par des molécules non apparentées. Concrètement, l'existence d'une telle réaction *in vivo* signifie que la dégranulation des mastocytes peut être déclenchée par une molécule différente de l'allergène initial responsable de la phase de sensibilisation [125]. La démonstration de ce

phénomène est basée sur l'inhibition de la fixation de l'allergène X sur l'IgE spécifique anti-X par une autre molécule Y, également reconnue par l'IgE anti-X, mais souvent avec une affinité plus faible. Cette réaction est évaluée *in vitro*, soit directement en mesurant la capacité d'un immunsérum à reconnaître différentes populations antigéniques (en contrôlant que cet antisérum avant immunisation ne reconnaît pas ces populations antigéniques) soit par la capacité de ces différentes populations antigéniques à déplacer la fixation de l'allergène homologue sur son anticorps (RAST, ELISA, Immonoblot).

1-9-3 Réactions croisées et allergie croisée

La mise en évidence de réactions croisées *in vitro* ou *in vivo* ne signifie pas forcément que les individus étudiés sont allergiques à la protéine Y. Dans de nombreux cas, bien que les tests *in vitro* soient positifs, les réactions allergiques *in vivo* vis à vis de Y sont absentes [125]. *In vitro*, la présence d'IgE réactives à un allergène, ne traduit pas nécessairement une sensibilisation à cet allergène. En effet une IgE spécifique prévue pour un allergène donné peut aussi se lier avec une affinité plus au moins grande à d'autres allergènes proches du premier (fréquence d'homologie) dans un produit différent. La liaison est monovalente et chaque molécule d'IgE liée à un épitope déclenche le signal. Dans le sérum, il existe une grande variété d'IgE libres qui provoquent un grand nombre de réactions croisées *in vitro*, sans rapport avec la clinique d'où le manque de sensibilité des tests biologiques. *In vivo* (prick test) les IgE sont fixées sur les mastocytes. L'obtention d'une réaction croisée, nécessite la liaison simultanée de deux molécules d'IgE ayant ou non la même spécificité avec un allergène. Ces contraintes conformationnelles supplémentaires par rapport à une réaction déclenchante normale réduisent la possibilité de réactions croisées seulement à quelques molécules présentant des épitopes communs [126].

En conséquence, les réactivités croisées doivent être analysées en fonction des tests *in vitro*, des tests cutanés et des tests cliniques. Il faut donc distinguer la réactivité croisée *in vitro*, la sensibilisation vraie mise en évidence par les tests cutanés ou par la libération de médiateurs chimiques et de l'allergie croisée vraie, *in vivo,* démontrée par des tests de provocation orale [123]. Ainsi l'allergie croisée est 5 à 7 fois moins fréquente que la sensibilisation croisée dans des études portant sur les légumineuses et la tomate [99]. Dans le cas de la réaction croisée bouleau-pomme, pêche, noisette, l'allergie croisée est 2 à 3 fois moins fréquente [127]. Ceci montre l'importance des tests de provocation orale ou labiale pour la confirmation du diagnostique d'allergie croisée.

1-10 Allergénicité

Le nombre de cas d'allergies est en augmentation constante. Les causes en seraient principalement les changements survenus dans les habitudes alimentaires, mais aussi dans les technologies utilisées en agronomie et dans l'industrie agroalimentaire, qui influenceraient l'allergénicité des protéines contenues dans les aliments. L'allergénicité d'une protéine est une activité immunobiologique qui ne se définit que par rapport à la population d'individus sensibilisés à cette protéine. Ce n'est pas une propriété inhérente à cette protéine et qui permettrait de la caractériser. Un certains nombres de procédés industriels peuvent modifier l'allergénicité. Ils impliquent :

Le stockage simple avant commercialisation des produits bruts, dont la durée et la température sont variables, peut entraîner la production de protéines de stress ou de protéines PR (pathogenesis related) aboutissant à la production de néo-allergènes (pomme, noix de pécan).

La conservation :

-Les phytohormones sont utilisées pour la conservation. Parmi elles l'éthylène qui influence le mûrissement des fruits et légumes et permet de maîtriser leur commercialisation. Les changements métaboliques induits peuvent déclencher une réactivité plus importante des IgE vis à vis des aliments traités.

-Les procédés chimiques pour la conservation des fruits et légumes crus prédécoupés.

Les traitements acides et basiques utilisés pour la préparation d'isolats (blé, orge).

La fermentation

L'hydrolyse chimique ou enzymatique diminuerait l'allergénicité [123].

Le lavage prolongé des chairs de poissons : Les protéines hydrosolubles sont éliminées et ne restent que les protéines non hydrosolubles. C'est le cas dans la préparation du surimi.

L'ajout de nombreuses protéines allergéniques comme additifs alimentaires ou auxiliaires de fabrication en raison de leurs propriétés d'agents de texturation (soja) ou bactéricides.

Les traitements thermiques : ils peuvent jouer un rôle important dans l'allergénicité [130]. Le traitement thermique peut entraîner des changements de structure des protéines particulièrement des protéines globulaires ayant une structure secondaire et tertiaire voire quaternaire. C'est le cas de la plupart des protéines végétales et animales. Il peut provoquer

des changements conformationnels irréversibles. A température suffisante, les protéines subissent une dénaturation irréversible de la structure primaire et secondaire. Cette phase est suivie d'une phase d'agrégation des protéines dénaturées. Ces agrégats peuvent aboutir dans certaines conditions à la constitution de gel. Le chauffage peut aussi induire d'autres changements tels que la rupture des ponts disulfures ou la réaction de Maillard (interaction sucre protéine). Dans la plupart des cas le chauffage n'affecte pas la stabilité de l'allergène vis à vis de l'immuno-réactivité. Il n'existe pas de corrélation entre le changement de structure des protéines et leur potentiel allergénique. Suivant les conditions, le traitement thermique peut ne pas modifier l'allergénicité, l'augmenter ou la diminuer. La majorité des allergènes d'origine animale est stable à la chaleur et une faible diminution de leur allergénicité est notée. En ce qui concerne les allergènes d'origine végétale, la situation est plus complexe. Certains résistent à la chaleur et leur allergénicité est inchangée, c'est le cas de la pèche, de l'arachide [128, 129]. Pour d'autres, on observe une diminution de l'allergénicité en fonction de la température et du temps de chauffage, comme c'est le cas pour l'arachide bouilli [90].

Une troisième catégorie d'allergènes comprenant aussi bien des allergènes d'origine animale que végétale se comporte différemment, le chauffage augmenterait leur allergénicité. C'est le cas des protéines de lait, de bœuf, de poisson, des crustacés, de la noix de pécan [130]. Il en est de même pour l'arachide grillée à haute température (140°C environ) dont l'augmentation de l'allergénicité (par rapport à celle de l'arachide crue) se manifeste par une capacité de liaison aux IgE 90 fois plus élevée que celle observée avec l'arachide crue [88]. Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer les modifications de l'allergénicité induites par le chauffage. Celles-ci seraient sous la dépendance de l'équilibre entre le nombre d'épitopes séquentiels et conformationnels accessibles. Lorsque l'équilibre est plus en faveur des épitopes conformationnels, l'allergénicité diminuerait. Dans le cas contraire, le traitement thermique a peu d'effets sur l'immuno-réactivité. La stabilité à la chaleur peut aussi être imputable au masquage d'épitopes comme c'est le cas pour Ara h1 [128] qui prend une structure trimérique dans un environnement contenant, une majorité d'épitopes. La protéine est dénaturée, des agrégats sont formés mais l'immunoréactivité n'est pas affectée. La structure quaternaire pourrait alors jouer un rôle significatif dans cette stabilité vis à vis du chauffage.

D'une manière générale, deux raisons sont évoquées pour expliquer l'augmentation de l'allergénicité : le démasquage d'épitopes par changement conformationnels et une modification chimique des épitopes aboutissent à la formation de néo-allergènes par la réaction de Maillard (interaction protéine sucre). Le chauffage peut aussi entraîner des interactions entre les protéines et d'autres molécules en dehors des sucres (lipides, minéraux, arômes, vitamines …) présents dans les aliments. Tel est le cas de très faibles quantités de protéines allergéniques présentent dans les huiles pressées à froid tels que les huiles de soja, d'arachide et de sésame dont l'interaction avec les lipides, sous l'influence de la chaleur, produit des néo-allergènes responsables de l'allergénicité particulières de ces huiles [130].

Les nouvelles technologies dont le génie génétique, peuvent aussi modifier le pouvoir allergisant des protéines.

1-11 Diagnostic d'une allergie alimentaire

Le diagnostic repose sur les éléments cliniques, sur l'identification des sensibilisations alimentaires et sur le diagnostic objectif de l'allergie par des tests de provocation orale. L'examen clinique est important en particulier chez les nourrissons et les enfants. Il permet d'objectiver les symptômes décrits. Parallèlement on établit un questionnaire détaillé. Pour mettre en relation certains aliments avec la symptomatologie. La chronologie entre l'ingestion d'un aliment et l'apparition des symptômes, le détail de ces symptômes, leur constance avec les expositions successives au même aliment, sont tous des éléments importants à faire préciser par le patient. Parfois, le questionnaire seul permet d'établir le diagnostic, surtout dans les cas de réactions rapides de type anaphylactique, urticarien, et asthmatique. Cependant, une enquête alimentaire complémentaire, se révèle nécessaire. Le patient note alors tous les jours, l'ensemble de ses consommations, conserve les étiquettes correspondantes et décrit les réactions allergiques survenues dans le cadre d'un journal alimentaire pendant une période de une à deux semaines. Cette enquête permet de repérer les fausses allergies alimentaires ainsi que la consommation d'allergènes masqués. En fonction de ces renseignements, un régime d'éviction alimentaire est pratiqué, qui avant d'être la thérapie quasi exclusive de l'allergie alimentaire, fait partie des tests de diagnostic. L'identification des sensibilisations alimentaires immédiate est démontrée par les tests cutanés et les tests biologiques.

Les tests cutanés : Ceux-ci ne sont valables que pour les allergies dépendantes des IgE. Parmi eux, le prick test est la technique la plus utilisée. Elle consiste à déposer sur la peau une goutte d'allergène au centre de laquelle on pratique une piqûre intradermique. La lecture du test s'effectue environ 20 minutes plus tard. Le test est considéré positif lorsque la papule mesure plus de 3 mm et est associée à un érythème périphérique. Ce bilan cutané est indispensable. Cependant, si cette méthode apparaît assez spécifique de l'allergène, elle ne permet pas de différencier l'état de sensibilisation d'un état allergique réel.

Les tests biologiques : Dans un premier temps on effectue un dosage des IgE spécifiques dans les sérums des patients. Cependant, d'autres tests complémentaires peuvent être également pratiqués. Il s'agit du dosage de l'histamine sérique ou plasmatique, du dosage de la tryptase, protéine secrétée par les mastocytes et retrouvée dans le sérum dans les heures qui suivent une réaction anaphylactique. Enfin, le dosage de l'ECP (Eosinophil cationic Protein) est parfois proposé dans le suivi de certaines réactions inflammatoires (AFFSA, 2002).

La différenciation entre une allergie alimentaire réelle et une simple sensibilisation est faite à l'aide de tests de provocation orale. Le but de ces tests est de reproduire les symptômes allergiques, en évitant cependant le déclenchement d'une réaction grave. Ces méthodes ne sont pratiquées que lorsque les autres éléments (manifestations cliniques, tests cutanés, dosages d'IgE) sont insuffisants pour diagnostiquer l'allergie et préciser l'aliment incriminé. Parmi ces tests de provocation : le test labial correspond à un test de contact de l'aliment au niveau des lèvres. Si les réponses sont faibles, un test de provocation orale est appliqué. Il consiste en l'ingestion de l'aliment suspect. Un test est considéré comme positif lorsque les symptômes ont été observés de quelques minutes à quelques heures après l'ingestion de l'aliment. Ce test doit s'effectuer sous surveillance médicale étroite. Il est potentiellement dangereux et est donc contre indiqué si l'allergie alimentaire d'un sujet s'est révélée par une anaphylaxie aiguë. Ce test permet de reproduire l'ensemble de la réaction allergique et d'estimer les doses réactogènes chez le malade. Répété régulièrement, il permet de suivre l'évolution de la gravité de l'allergie alimentaire chez le patient. Les tests de provocation par voie orale en double aveugle (DBPCFC : Double-Bind, Placebo-controlled Food Challenge) constituent la méthode de référence mais ils ne peuvent être pratiqués qu'en milieu hospitalier spécialisé en raison de la difficulté de leur mise en place (AFSSA, 2002).

1-12 Traitement

Il existe dans le cas des allergies alimentaires deux types de traitement : le traitement préventif reposant sur le régime d'éviction et le traitement du choc anaphylactique.

Traitement préventif

Il semble de plus en plus évident que l'on peut diminuer l'incidence de la maladie atopique ou tout au moins de son expression clinique. Le meilleur traitement de l'allergie alimentaire est d'éviter la cause. Il est évident qu'une prévention efficace débute par l'identification de ou des aliments responsables puis l'éviction du régime alimentaire qui est dans tout les cas indispensables. Le patient et sa famille devront éviter, non seulement l'aliment visible, mais aussi l'allergène rencontré dans des aliments préparés industriellement. Le traitement préventif est donc un traitement fondamental.

Traitement du choc anaphylactique

L'efficacité du traitement repose sur la reconnaissance rapide de la symptomatologie et sur une prise en charge thérapeutique immédiate. Elle est basée sur l'administration rapide d'adrénaline afin de s'opposer à la dégranulation des mastocytes et des basophiles. En cas d'ingestion accidentelle, une réaction bénigne de symptôme exclusivement cutané, nécessite un traitement antihistaminique par voie orale. En revanche, une réaction plus sévère avec une symptomatologie respiratoire (laryngé et/ou respiratoire basse) associée ou non à des manifestations cardiovasculaires et/ou une perte de connaissance, justifie une injection immédiate d'adrénaline. La rapidité d'administration de l'adrénaline influence directement le pronostic [30, 33]. Le bon usage de l'adrénaline recommande la voie intramusculaire, dans la cuisse, à l'aide d'un auto-injecteur à usage unique, à la posologie de 0,15 à 0,25 mg chez l'enfant et 0,3 à 1 mg chez l'adulte, à répéter en fonction de la sévérité et de l'évolution des signes de menace vitale (bronchospasme et collapsus vasculaire). La voie intra-musculaire est supérieure à la voie sous-cutanée en raison d'un meilleur profil cinétique. Une prise en charge en milieu hospitalier est nécessaire puisqu'un remplissage vasculaire est indispensable en raison de l'hypovolémie du au choc anaphylactique. D'autres médicaments sont associés ; corticoïdes et anti-histaminiques par voie injectable ou per os (www.sante.gouv.fr).

Autres traitements

D'une manière générale les traitements de l'allergie ont pour objectif principal de limiter certains effets secondaires. Ils ne peuvent en aucun cas se substituer à un régime d'éviction. Les traitements reposant sur l'immunothérapie spécifique (ou désensibilisation spécifique) sont actuellement du domaine de quelques services spécialisés et son indication est très restreinte. Les résultats obtenus avec ce type de traitement, fréquemment utilisé dans le cadre des allergies respiratoires par exemple, ne sont pas très encourageants pour l'instant lorsqu'on l'applique dans le domaine des allergies alimentaires.

1-13 Allergies alimentaires et modèles animaux

Depuis une quinzaine d'année, l'incidence et la prévalence de l'allergie alimentaire ne cessent d'augmenter du fait des modifications des habitudes alimentaires, de l'introduction de nouveaux produits et de l'évolution des technologies utilisées pour la fabrication des aliments. Chez l'homme, les mécanismes qui régissent les allergies alimentaires sont loin d'être élucidés et leur appréhension se heurte à de nombreux obstacles. De plus, la connaissance de l'allergénicité des aliments provient uniquement de la clinique. La nécessité d'évaluer, pour le consommateur, les risques que peut présenter l'ingestion de nouveaux aliments qu'ils n'avaient pas l'habitude de consommer, se fait sentir. Toutes ces raisons expliquent l'intérêt croissant pour les modèles animaux d'anaphylaxie (production d'IgE, signes cliniques) induite par les aliments.

De nombreux modèles d'animaux allergiques ont été développé (cobaye, chien, porc, rat et souris) [131, 135]. Parmi tous ces modèles, le modèle souris présente des caractéristiques intéressantes : son génome est bien connu, son système immunitaire est proche de celui de l'homme (réponses Th1 et Th2 impliquées dans les mécanismes allergiques chez l'homme et la souris) [136, 137]. Ce modèle permet, de plus, de disposer de nombreuses technologies, de réactifs variés, d'animaux knock-out et transgéniques pour appréhender, caractériser et manipuler les réponses immunologiques. L'immunisation intrapéritonéale avec ou sans adjuvant, est la voie de sensibilisation la plus utilisée chez la souris, pour étudier l'allergénicité, car elle permet une réponse immune forte en IgE.

Les modèles animaux sont justifiés :

A- Ils permettent d'étudier d'une façon plus approfondie la phase I (sensibilisation indépendante des mastocytes) de la réaction allergique dont les mécanismes sont mal connus par rapport à la phase II (déclenchement des signes cliniques dépendants des mastocytes) dont l'approche est plus facile. Grâce à ces modèles on peut analyser les effets

doses, comparer l'efficacité des différentes voies d'administration : la voie systémique (sous cutanée ou intrapéritonéale) et la voie orale (gavage gastrique ou voie orale naturelle plus proche de la réalité afin d'obtenir une pathologie voisine de celle observée chez l'homme) et essayer de définir le rôle de substances adjuvantes : médicamenteuses (alun, toxine cholérique), additifs (carragheen) ou de composants naturels (saponine).

B- Ils concourent à l'évaluation du potentiel allergénique des nouveaux aliments et particulièrement les organismes génétiquement modifiés. Parmi les critères retenus par la FAO/OMS 2001, pour caractériser l'allergénicité des OGM, figure l'utilisation des modèles animaux. D'après la FAO, l'allergénicité des nouvelles protéines doit être établie par rapport à des allergènes alimentaires dont les réponses sont connues être forte ou faibles et par rapport à des composants alimentaires non allergéniques. Il existe bien un spectre d'allergénicité pour les protéines alimentaires. Cependant, il est difficile d'estimer, avec un certain degré de certitude, le potentiel allergénique relatif des protéines individuelles dans les aliments et entres les aliments. Ceci explique que les modèles animaux d'allergie ne sont pas suffisants à eux seuls pour l'évaluation de l'allergénicité.

C- Ces modèles sont aussi nécessaires pour tester l'efficacité et la sécurité de nouvelles thérapies ; immunisation, désensibilisation avec des peptides ou des protéines recombinantes et pour tester l'hypoallergénicité de certains produits.

2- INTRODUCTION DU TRAVAIL

Les allergies alimentaires résultent de réactions immunologiques excessives de l'organisme en réponse à un second contact avec une substance allergénique présente dans l'aliment. Les allergènes ont des origines variées et tous les aliments sont des sources potentielles d'allergènes.

Un certains nombres d'allergènes majeurs (arachide, œuf, poisson, lait, fruits à coque …), dont les dérivés sont fréquemment utilisés comme ingrédients dans les préparations alimentaires, ont été identifiés. Bien que l'éviction de ces composants alimentaires reste le moyen le plus sûr de prévenir ces réactions indésirables, le risque zéro n'existe pas et le nombre de cas d'allergie alimentaire et de polysensibilisation ne cesse d'augmenter. C'est pourquoi la protection des consommateurs nécessite que ceux-ci soient informés de la présence de tels ingrédients. Différentes réglementations apparaissent selon les pays et imposent des contraintes aux industriels.

En 1995, la Commission du Codex Alimentarius (C.A.C), a établit la liste des allergènes alimentaires qui devraient être étiquetés. Cet organisme lié à l'Organisation Mondiale de la Santé et à l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture a pour mission d'établir des normes uniformes pour protéger la santé des consommateurs et pour s'assurer de pratiques loyales dans le commerce des aliments.

La C.A.C a adopté une liste, dont la mise à jour est confiée au JECFA (Joint Expert Group on Food Additives**)**. Figurent dans la Nouvelle section (4.2.1.4) du Codex Alimentarius : " les aliments et ingrédients suivants reconnus comme provoquant une hypersensibilité et devant toujours être déclarés: céréales contenant du gluten (blé, seigle, orge, avoine, épeautre ou leurs espèces hybridées et produits dérivés) ; crustacés et produits dérivés ; oeufs et ovoproduits ; poissons et produits de la pêche ; arachide, soja et produits dérivés; lait et produits laitiers (y compris le lactose); fruits à coque et produits dérivés et sulfites en concentration d'au moins 10 mg/kg". La présence de ces ingrédients doit toujours être signalée, même si, l'étiquetage n'est pas obligatoire pour l'aliment considéré (chocolat, fromages, vins...). Cette mesure consiste à discerner les allergènes les plus dangereux et à exclure ceux-ci des dérogations existantes à l'obligation générale d'étiqueter les ingrédients. De ce fait, Conseil et Parlement européens ont donc souhaité amender la directive européenne n° 2000/13 concernant l'étiquetage. Selon la position commune n°16/2003 du Conseil Européen, toute substance mentionnée dans la liste des allergènes majeurs qui est

utilisée dans la production d'un aliment et qui est encore présente dans le produit fini, devra être étiquetée afin d'assurer la sécurité alimentaire aux consommateurs sensibilisés à ces allergènes.

Dans cette perspective et à la demande de la commission technique de l'union des œnologues de France (UOEF) et de la CANA (Cooperative Agricole de Noelle Ancenis), nous nous sommes intéressés aux produits de collage des vins et à la réaction croisée arachide-lupin. Nous avons étudié, dans le premier cas, le risque d'allergie lié à la présence des résidus des produits de collage dans les vins commercialisés et dans le deuxième cas, le risque potentiel d'allergie croisée arachide-lupin.

2-1 Risque allergique et vin

L'Australie est le premier pays, qui a introduit l'étiquetage du vin. En décembre 2002, l'Australie a exigé l'étiquetage obligatoire des différentes protéines alimentaires (œuf, poisson, lait et les fruits à coque ou leurs dérivés) utilisées pour le collage du vin. D'autres pays comme le Canada, l'Union Européenne et les USA mettent en place une telle législation.

L'Union des Oenologues de France nous a donc proposé de réaliser une étude sur les résidus de colle et sur leur éventuelle activité allergénique. L'obligation d'étiquetage sera réservée aux allergènes présents à un niveau pour lequel la recherche scientifique a prouvé le risque de réactions allergiques.

Les colles sont utilisées en œnologie dans le but de suppléer une clarification spontanée difficile, de stabiliser durablement un vin ou d'améliorer ses caractéristiques organoleptiques. Pour réaliser ce collage, divers produits sont utilisés comme les protéines animales (gélatine, albumine, caséines, colle de poisson), mais aussi d'autres produits d'origine organique (tanins, PVPP (PolyVinyl-PolyPyrrolidone), charbons œnologiques) ou minérale (bentonites, dioxydes de silice ou ferrocyanure de potassium). Certaines de ces molécules ont des propriétés allergisantes chez l'homme. Bien qu'utilisées à de faibles concentrations et malgré leur élimination par sédimentation et/ou filtration, des traces de ces molécules peuvent persister dans le vin. Celles-ci pourraient être suffisantes pour déclencher une réaction allergique chez une personne préalablement sensibilisée. Néanmoins lorsque le vin vieillit, ces traces peuvent également subir des transformations/dégradations et perdre leurs propriétés allergisantes. Il est donc nécessaire d'évaluer la présence de ces allergènes dans les produits finaux.

Ainsi, le but de notre travail, est de déterminer la présence de résidus de colles dans les vins et leur capacité à déclencher une réaction anaphylactique. Il n'y a pas eu, jusqu'à présent, de cas avérés d'allergie avec des vins collés. Pour cela, nous avons mis en au point des modèles expérimentaux d'animaux (souris) allergiques aux différentes colles pures. Les souris reconnues allergiques pourront ensuite être utilisées pour vérifier si les vins contiennent encore des traces de colles.

2-2 Risque allergique et réaction croisée arachide lupin

De nombreuses légumineuses, comme un grand nombre de protéines dans notre environnement, possèdent des propriétés allergisantes. Parmi celles-ci, l'arachide. Les phénomènes de réactivité croisée *in vitro* sont très fréquents mais ils ne rendent pas compte du risque réel d'allergie, beaucoup plus rare. Ainsi sur 100 sujets allergiques à l'arachide, la réactivité croisée avec d'autres légumineuses est observable dans 40 % des cas alors que l'allergie croisée ne concerne que 10 % des sujets [138]. Cette information est pourtant primordiale avant la prescription d'un régime d'exclusion. En effet, un maximum d'informations doit être recueilli afin de n'exclure de la consommation que les aliments représentants un véritable danger pour l'individu. Ceci permet d'augmenter les chances de réussite du suivi du régime d'éviction et de réduire les problèmes de carence ou de déséquilibre nutritionnel sous-jacents [138].

L'allergie à l'arachide est un problème important de santé publique compte tenu de sa fréquence et de sa gravité [123]. Il risque malheureusement de s'étendre à un grand nombre de pays avec l'uniformisation des habitudes alimentaires et l'utilisation de l'arachide ou de ses dérivés comme additifs dans les produits de grande consommation. La connaissance des réactions allergiques croisées potentielles entre l'arachide et les autres protéines végétales représente un challenge important pour l'industrie agroalimentaire. Toute légumineuse (famille de l'arachide) doit être considérée comme potentiellement à risque chez les patients allergiques à l'arachide [14], or le lupin est une légumineuse. En France, depuis 1997 la farine de lupin peut être mélangée avec la farine de blé jusqu'à un taux maximum de 10 %, sans obligation d'en informer le consommateur. Elle peut donc être consommée dans divers produits alimentaires [95]. Quelques rares cas d'allergie au lupin ont été rapportés [97, 139]. De plus, le risque d'allergie croisée entre l'arachide et le lupin a été décrit [35, 96].

Notre but est de vérifier si la présence de farine de lupin est un risque sérieux d'allergie croisée pour les individus allergiques à l'arachide. Pour cela, nous avons eu recours à des modèles expérimentaux de souris allergiques à l'arachide.

Ce travail se situe, dans les deux cas, dans la ligne édictée par l'union Européenne qui vise à rendre obligatoire l'étiquetage de certains ingrédients.

3- MATERIELS ET METHODES

3-1 Animaux

3-1-1 Souris

Plusieurs souches de souris consanguines sont utilisées lors des différents protocoles d'immunisation. Le choix des souches de souris a porté sur la nature des haplotypes H-2 du complexe majeur d'histocompatibilité. Nous avons sélectionné deux souches de souris d'haplotype H-2^k (C3H et CBA), une souche de souris d'haplotype H-2^d (BALB/c), une souche de souris d'haplotype H-2^s (SJL) et une souche de souris d'haplotype H-2^b (DBA/2). Ces souris proviennent toutes de chez Harlan. Les effectifs sont variables d'un protocole à l'autre. Ce sont des souris femelles âgées de quatre semaines, acclimatées deux semaines avant tout début de protocole expérimental (animalerie du laboratoire, conditions d'hébergement conformes à la réglementation). L'animalerie est alimentée en air filtré et est en surpression par rapport à l'extérieur. Elle est soumise à 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, la température est régulée à 20°C. Les animaux sont nourris et abreuvés *ad libitum*. Les manipulations sur les animaux sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, excluant tout état de stress susceptible d'interférer avec les résultats.

3-1-2 Lapins

Les lapins (n=6) utilisés pour la préparation d'anticorps spécifiques anti-colles, sont des mâles pesant 3 kg au moment de la réception. Les protocoles sont mis en route après quinze jours d'acclimatation. Une seule souche de lapin a été utilisée : Hsdlf. New Zealand White provenant de chez Harlan. Les lapins ont été placés dans des cages individuelles et sont nourris et abreuvés *ad libitum*.

3-2 Les allergènes

3-2-1 Les colles allergisantes utilisées pour la clarification du vin

Les colles pures proviennent de chez ITV (Institut Technique du Vin). Elles sont utilisées pour la préparation de solutions servant à la clarification des vins.

3-2-1-1 Caséine

La caséine, hétéroprotéine qui contient du phosphore, se trouve dans le lait à l'état de sel calcique. Elle est obtenue par la coagulation du lait écrémé. Il s'agit d'un agent de collage indiqué pour le traitement des oxydations des moûts et des vins. Elle ne peut être mise en œuvre que dans de l'eau alcalinisée ou sous forme de caséinate de potassium.

3-2-1-2 Colles de poisson

La colle de poisson est préparée avec la vessie natatoire, les ouïes, les oreillons de certains poissons, notamment des esturgeons. La colle de poisson flocons est présentée en feuilles transparentes incolores ou légèrement jaunâtres, ou le plus souvent en lanières ayant l'apparence du parchemin sec ou sous forme vermiculée ou en poudre. Elle gonfle dans l'eau froide en devenant opaque, elle se dissout dans l'eau chaude acidifiée par l'acide tartrique. La colle de poisson existe aussi sous forme préhydrolysée soluble. Ces deux types de colle sont utilisés pour la clarification des vins blancs et rosés.

3-2-1-3 Albumine d'œuf

L'albumine d'œuf est obtenue par dessiccation des blancs d'œufs frais, elle se présente sous forme d'une poudre blanche, fine, très légère, incomplètement soluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions alcalines. L'albumine d'œuf se présente sous deux formes avec et sans lysozyme. Ces deux types de colles sont employés pour la clarification des vins.

3-2-2 L'arachide

Les cacahuètes, non décortiquées, sont achetées dans les grandes surfaces. Elles sont utilisées après décortication soit sous forme entière ou sous forme d'extrait. L'extrait est préparé à partir des graines broyées (100 g) et dégraissées. Le broyat est mis en suspension dans 250 ml d'acétone, agité pendant une heure à 4°C. La suspension est décantée et la phase lipidique est éliminée. Le précipité obtenu est remis en suspension dans 250 ml de diethyl éther suivi d'une agitation et d'une décantation. Ce traitement est répété cinq fois. Le précipité recueilli est séché sous hotte pendant une nuit entière. Le précipité dégraissé, est repris dans 300 mL de bicarbonate d'ammonium (0,1M ; pH 8), agité pendant 20 heures à 25°C et centrifugé pendant 40 minutes à 48 000 g (centrifugeuse SR 20.22) à 4°C. Le surnageant recueilli est congelé puis lyophilisé. Le produit final est conservé à 4°C.

3-2-3 Le lupin

La farine de lupin blanc doux ultrafine a été fournie par la Cooperative Agricole de Noelle Ancenis (CANA).

3-3 Adjuvants

3-3-1 Hydroxyde d'aluminium

L'hydroxyde d'aluminium ou alun provient de chez PIERCE. Il est préparé à partir d'une solution contenant 40 mg/mL d'hydroxyde d'aluminium et 40 mg/mL d'hydrodyde de

magnesium. En plus, cette solution contient aussi des agents stabilisants. L'alun est un adjuvant utilisé pour la vaccination chez l'homme et chez les animaux.

3-3-2 Toxine cholérique

La toxine cholérique (SIGMA ; Saint-Louis, USA, référence C-8052) est utilisée en solution dans de l'eau distillée à raison de 1mg/mL. La solution est conservée à -20 °C. La solution est diluée de manière à ce que la solution allergénique à administrer contienne 10 µg de toxine par souris.

3-3-3 Adjuvants complet et incomplet de Freund

Les adjuvants (Sigma) sont constitués à la base d'huile de paraffine, 85%, et de mannide monooleate, 15%. L'adjuvant complet de Freund est complété par 0,005% de *Mycobacterium butyricum tués*. Une émulsion des adjuvants avec l'allergène est réalisée en mélangeant un volume égal de chaque constituant, puis en agitant fortement le mélange. Ces adjuvants sont utilisés pour l'immunisation des lapins à raison de 500 µL par lapin.

3-3-4 Maalox

Le maalox est un médicament contenant des antiacides. Il est utilisé chez l'adulte, dans les cas de brûlures d'estomac et de reflux gastro-oesophagien. Chaque comprimé renferme 400 mg d'oxyde d'aluminium hydraté, 400 mg d'hydroxyde de magnésium. Les autres composants étant des excipients (Sorbitol à 70% non cristallisable, maltitol, glycérol à 85%, saccharine sodique, arôme citron, talc et stéarate de magnésium).

3-4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines dans l'extrait d'arachide a été réalisé à l'aide du Kit « NanoOrange Protein Quatitation Kit » (Molecular Probes). L'intensité de la fluorescence a été mesurée au cytofluor (R série 4000. Perseptive Biosystems) avec une longueur d'onde d'excitation située entre 470 – 490 nm et une longueur d'onde d'émission entre 570 – 590 nm.

3-5 Immunisation des modèles animaux

3-5-1 Aux colles œnologiques

3-5-1-1 Chez le lapin

Les lapins sont répartis en 3 groupes de deux. Chaque groupe reçoit une colle bien spécifique (Albumine avec lysozyme, colle de poisson flocon ou la caséine). L'antigène est injecté en sous-cutané en plusieurs points sur le dos à la dose de 1 mL par lapin soit 1 mg de colle pure par lapin. Un rappel est réalisé 3 semaines après la sensibilisation suivie d'un

A

Souches de souris	Antigène 10 µg/ souris	Immunisations ip + $Al(OH)_3$)	Prélèvements	Test de provocation ip (1 mg) / souris
C3H, CBA, SJL	AsL, AaL, IF, IS, K	$J_0 - J_{11}$	$J_{-7} - J_{14}$	$J_8 - J_{16}$
DBA/2	K, K-bentonite	$J_0 - J_7 - J_{16}$	J_{-7} - J_9 - J_{14} - J_{23}	$J_{10} - J_{21}$

B

Souches de souris	Antigène 3,2µg/souris	Immunisations ip ± $Al(OH)_3$)	Prélèvements	Test de provocation ip, 1mg/souris
C3H, CBA, SJL, BALB/c	Extrait d'arachide	J_0 - J_{10} - J_{21}	J_{-7} - J_{15} - J_{30} -J_{45}	J_{60}

C

Souches de souris	Antigène 5 mg/souris	Immunisations GG+TC/ maalox	Prélèvements	Test de provocation GG 10mg/souris
C3H, CBA, SJL	Extrait d'arachide	J_0 - J_7	J_{-7} - J_{15} - J_{20} -J_{30}	J_{21} - J_{35}

D

Souches de souris	Antigène 2,5mg/24h/souris	Immunisations v.o	Prélèvements	Test de provocation i.p 1mg/souris
C3H, CBA, SJL	extrait d'arachide	J_0 - J_7- J_{14} ... J_{90}	J_{-7} - J_{15}- J_{30} -J_{45}- J_{60}	J_{65}

E

Souches de souris	Antigène 3g/24h/souris	Immunisations v.o	Prélèvements	Test de provocation i.p 1mg/souris
C3H, CBA, SJL	arachide entière	J_0- J_7- J_{14} ... J_{60}	J_{-7} - J_{15}- J_{30} -J_{45}	J_{50}

Tableau 5 : Les protocoles d'immunisations :

A: Protocole des immunisations intra-péritonéales, des prélèvements sanguins et des tests de provocation (i.p) chez quatre souches (C3H, CBA, SJL et DBA/2) de souris immunisées avec les différentes colles (albumine avec et sans lysozyme, colle de poisson flocon et colle de poisson préhydrolysée, caséine et caseiné-bentonite). **B**: Protocole des immunisations intra-péritonéales avec l'extrait d'arachide, des prélèvements sanguins et des tests de provocation par voie i.p chez quatre souches de souris C3H, CBA et SJL et BALB/c. **C**: Protocole d'immunisation avec l'extrait d'arachide par gavage gastrique en présence de la toxine cholérique, des prélèvements sanguins et des tests de provocation par gavage gastrique chez trois souches de souris C3H, CBA et SJL. **D** : Protocole d'immunisation avec l'extrait d'arachide par voie orale, des prélèvements et des tests de provocation par voie i.p chez trois souches de souris C3H, CBA et SJL. **E** : Protocole d'immunisation avec l'arachide en entier par voie orale, des prélèvements et des tests de provocation par voie i.p chez trois souches de souris C3H, CBA et SJL.

deuxième rappel 3 semaines plus tard. Des prélèvements sanguins de 2 à 5 mL dans la veine marginale de l'oreille du lapin ont été effectués deux semaines après chaque immunisation. Une saignée est effectuée avant immunisation pour chaque lapin (sérum non immun). Après centrifugation du sang, 15 minutes à 2700 g, +4°C, le sérum est délicatement prélevé puis congelé à - 20°C. Les dosages d'anticorps spécifiques sont effectués par la technique ELISA.

3-5-1-2 Chez la souris

Quatre souches de souris consanguines C3H (H-2^k), CBA (H-2^k), DBA/2 (H-2^b) et SJL (H-2^s) de fond génétique différent (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, CMH) ont été utilisées. Le protocole expérimental est décrit dans le tableau 5A. Les souris de chaque souche sont réparties en 5 groupes de trois souris correspondant aux 5 colles utilisées. Pour chaque colle les souris des 3 souches sont immunisées par voie intrapéritonéale. Chaque souris reçoit 280 µL de solution contenant 10 µL de la solution antigénique (10 µg de colle pure), 70 µL de la solution d'alun (2,8 mg d'alun) et 200 µL du PBS. Les injections intrapéritonéales ont lieu à J_0 et J_{11}. Des prélèvements sanguins retro-orbitaires sont effectués à J_{-7} et J_{14}. Les tests de provocation sont réalisés par voie intrapéritonéale. Chaque souris reçoit une injection de 100 µL de solution contenant 1 mg de colle pure à J_8 et J_{16} (tableau 5A).

Un deuxième protocole de sensibilisation a été mis en route sur la souche DBA/2 avec la caséine et la caséine bentonite, à la même dose que pour les autres colles. Les conditions expérimentales sont similaires à celles du premier protocole mais l'immunisation comporte 3 injections à J_0 , J_7 et J_{16} et les tests de provocation par voie intrapéritonéale ont lieu à J_{10} et J_{21} (tableau 5A). Au cours de ces deux protocoles, des prélèvements sanguins sont effectués avant et après immunisation (tableau 5A), 150 µL de sang sont prélevés par ponction retro-orbitaire. Les sérums, congelés à - 20°C, sont utilisés pour le dosage des immunoglobulines spécifiques IgE, IgG1, IgG2a et IgGt.

3-5-2 A l'arachide

3-5-2-1 Immunisation par voie intrapéritonéale

Les souris de quatre souches C3H (H-2^k), CBA (H-2^k), BALB/c (H-2^d) et SJL (H-2^s) sont utilisées au cours de ce protocole, décrit dans le tableau 5B, en raison de 10 souris par souche. Les immunisations sont faites en présence ou absence d'alun. La solution injectable est préparée à partir d'une solution d'extrait d'arachide à 20 % dans de l'eau distillée. A 8 µL

de cette solution, sont ajoutés soit 7,5 mL de PBS, soit 3,75 mL de la solution d'$Al(OH)_3$ plus 3,75 mL de PBS. Chaque souris reçoit par voie intrapéritonéale 150 µL de cette solution soit 3,2 µg d'extrait d'arachide (équivalent à 1 µg de protéines) et 3 mg d'alun quand il est présent. Les immunisations ont lieu à J_0, J_{10} et J_{21}. Les prélèvements sanguins sont effectués à J_{-7} , J_{15}, J_{30} et J_{45}. Les sérums sont congelés à - 20°C et utilisés pour le dosage d'anticorps spécifiques.

Les tests de provocation par voie intrapéritonéale à J_{60} sont effectués à partir d'une solution contenant 10 mg d'extrait d'arachide (3,1 mg de protéines) dans 1 mL de PBS et chaque souris reçoit 100 µL de cette solution soit 1 mg d'extrait d'arachide (équivalent à 0,31 mg de protéines). Pour l'étude de la réaction croisée arachide-lupin, le test de provocation est effectué de la même manière mais à partir d'une solution de farine de lupin (1 mg de farine de lupin dans 100 µL de PBS).

3-5-2-2 Immunisation par voie orale

Les souris de chacune des trois souches C3H ($H\text{-}2^k$), CBA ($H\text{-}2^k$) et SJL ($H\text{-}2^s$) sont immunisées par voie orale naturelle ou par gavage gastrique

- Immunisation par gavage gastrique

Les souris de chaque souche sont réparties en quatre groupes. Le protocole expérimental est décrit dans le tableau 5C. Dans le premier groupe, chaque souris (n=4) reçoit par intubation gastrique 250 µL d'une solution contenant 5 mg d'extrait d'arachide (1,5 mg de protéines) et 10 µg de toxine cholérique comme adjuvant. Les gavages gastriques sont effectués à J_0 avec un rappel à J_7. Les souris du second groupe (n = 3) reçoivent chacune 250 µL de solution d'arachide contenant 5 mg d'extrait d'arachide, sans adjuvant. Celle du troisième groupe (groupe témoin, n = 3) reçoivent la toxine cholérique seule. Quant aux souris du quatrième groupe (CBA et SJL ; n = 5), elles reçoivent chacune 250 µL de solution contenant 5 mg d'extrait d'arachide associé à 0,5 mg de maalox comme adjuvant. Les prélèvements sanguins sont effectués à J_{-7},J_{15}, J_{20} et J_{30} pour tous les groupes. Deux tests de provocation par gavage gastrique sont effectués à J_{21} et à J_{35} sur les quatre souches de souris à partir d'une solution contenant 10 mg d'extrait d'arachide dans 1 mL du PBS et chaque souris reçoit 200 µL de cette solution (10 mg d'extrait d'arachide soit 3,1 mg de protéines) (tableau 5C).

- Immunisation par voie naturelle (antigène dans la nourriture)

A partir d'extrait d'arachide

Un mélange de 2,5 mg d'extrait d'arachide lyophilisé (800 µg de protéines) et de poudre alimentaire standard pour rongeurs (P_{14}, 3g) est donné *ad libitum* à chaque souris (n=10) à jeun pendant 24 heures une fois par semaine, pendant 3 mois avec ou sans alun. L'alun est administré par voie intrapéritonéale la veille de chaque administration orale d'arachide. Les souris sont observées pour noter l'apparition éventuelle de manifestations cliniques ou de refus de consommation. Des prélèvements sanguins sont effectués tous les quinze jours (J_{-7}, J_{15}, J_{30}, J_{45}, J_{60}). Les tests de provocation sont effectués par voie intrapéritonéale à raison de 1 mg d'extrait d'arachide par souris (tableau 5D).

A partir de l'arachide entier

Les souris (n=5 par souche) sont mises à jeun pendant une nuit entière, elles reçoivent durant 24 heures 3 g de graines d'arachide (équivalent à 21 mg de protéines) sous forme de cacahuètes décortiquées. Ce protocole est appliqué une fois par semaine et pendant 2 mois avec ou sans toxine cholérique administrée par gavage gastrique la veille de chaque administration orale de graine d'arachide (tableau 5E).

3-6 Evaluation de l'allergie

3-6-1 Signes biologiques : ELISA

Les titres d'anticorps spécifiques pour les différents isotypes d'immunoglobulines: IgE, IgG1, IgG2a, IgG totales ont été mesurés. Les dosages sont effectués, par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sandwich, dans des microplaques de 96 puits à fond plat (Nunc Maxisorp). Les microplaques sont recouvertes par l'antigène (caséine, albumine d'œuf avec et sans lysozyme, colle de poisson flocon et préhydrolysée, arachide ou lupin) à des concentrations différentes.

Les microplaques sont incubées pendant au moins une nuit à 4 °C. Après un lavage avec du PBS, Tween 20, 0,05% (PBS/Tw), 150 µL de PBS, BSA 3% sont déposés dans les puits et les microplaques sont incubées pendant une heure à 37 °C. Les microplaques sont rincées par du PBS/Tw et 50 µL de sérums de souris dilués dans du PBS, BSA 1%, Tw 0,05% sont déposés dans les puits. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 2 heures à 37°C. Un autre lavage est effectué avec du PBS/Tw avant le dépôt de l'anticorps monoclonal biotinylé (pour les IgE spécifiques : Pharmingen 02122D à 2µg/mL, pour les IgG1 : Pharmingen 02232D à 2 µg/mL, pour les IgG2a : Pharmingen 02012D) et pour les IgG

totales, un anticorps polyclonal : B9904 Sigma. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37 °C. Après un lavage avec du PBS/Tw, 50 µL d'une dilution de streptavidine peroxydase Sigma (E-2886) au 1 :5000 sont ajoutés. Les microplaques sont incubées pendant 30 minutes à 37 °C. Après un lavage, l'eau oxygénée associée avec un chromogène : l'orthophénylènediamine (OPD ; Sigma P-1526), dans du tampon citrate de sodium (0,05M à pH 5,1) sont ajoutés. La réaction colorée se développe en 30 minutes à températures ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H_2SO_4 2N permet de stopper la réaction. L'absorbance à 490 nm est mesurée par un lecteur de microplaques (Bio-tek Instruments ; EL 309). Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans chaque plaque afin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure. Les immunoglobulines spécifiques (IgGt, IgG1, IgG2a et IgE) sont dosées chez les différents groupes de souris, avant et après immunisation. Pour comparer les différents dosages, nous pouvons soit déterminer le titre de chaque échantillon et ensuite comparer les titres soit pour un isotype nous pouvons déterminer une dilution, mesurer les absorbances des échantillons à cette dilution et comparer ensuite les différentes absorbances. C'est cette dernière méthode que nous avons choisi. Pour permettre les comparaisons, une même dilution est utilisée pour les différents isotypes : 1.10^{-1} (IgE) et 1.10^{-5} (IgG totales, IgG1 et IgG2a) spécifiques anti-arachide, 1.10^{-1} (IgE), 1.10^{-2} (IgG totales et IgG1), et 4.10^{-2} (IgG2a) spécifiques anti-colles pures. Nous avons mesuré les titres en anticorps spécifiques sériques (IgE, IgG totales, IgG1 et IgG2a) avant et après les sensibilisations.

3-6-2 Signes cliniques : test de provocation

Ils ont été effectués sur l'animal sensibilisé, soit par une injection unique, sans adjuvant, de 1 mg d'allergène par voie i.p, soit par administration intragastrique de 10 mg d'allergène. La signification clinique a été évaluée par l'analyse des signes cliniques obtenus après challenge. Les signes de manifestation allergique, sont observés 10 à 15 minutes après injection intrapéritonéale de l'antigène sans adjuvant et l'intensité de la réaction est maximale entre 20 et 40 minutes [140, 141].

La classification admise pour mesurer les manifestations allergiques est la suivante :

0 : pas de symptôme

1 : grattement et frottement du nez et de la tête

2 : gonflement autour des yeux, poils hérissés, baisse de l'activité physique avec augmentation des mouvements respiratoires

3 : cyanose autour de la bouche et de la queue, difficultés respiratoires

4 : absence d'activité physique, convulsions

5 : mort

3-7 Préparation des échantillons de vins collés au laboratoire

3-7-1 Caractéristiques des vins sélectionnés

Trois types de vin ont été sélectionnés :

- Cépage Chenin blanc (C)

- Cépage Sauvignon blanc (S)

- Cépage Cabernet Franc rouge (CF)

Les échantillons de vin proviennent du Val de Loire (ITV de Tours). Ils ont été conservés à 14°C, en bonbonne de 10 litres, mis en bouteille de 1 litre. Les bouteilles sont transportées au laboratoire où elles sont conservées à 20 °C.

3-7-2 Collage expérimental au laboratoire

3-7-2-1 Collage à la caséine

Solution de caséine

Dissoudre 2 g de poudre de caséine dans 100 mL d'eau du robinet. Laisser reposer la solution pendant 4 heures avant de l'incorporer dans le vin. Un échantillon de 50 mL de solution de caséine est congelé, pour servir de témoin de solution de colle.

Echantillons de vin collé à la caséine :C-K50

Vingt cinq millilitres de la solution de caséine à 2% sont mélangés à un litre de Chenin. La solution est agitée. Cinquante millilitres sont prélevés avant collage. Cinq cent millilitres sont prélevés aussitôt après le collage. Le reste de la préparation est stocké pendant 24 h à 20°C et quatre cent millilitres en sont retirés et filtrés. Les cinquante millilitres restant constituent la lie de colle. Ces quatre échantillons sont ensuite congelés puis lyophilisés et enfin stockés à -20°C.

3-7-2-2 Collage aux Ichtyocolles

Deux colles de poisson ont été utilisées: une ichtyocolle de poisson flocon et une ichtyocolle de poisson préhydrolysée

A- Solution d'ichtyocolle avec flocons (IF) à 1 %

Dissoudre 2,5 g d'acide tartrique dans 500 mL d'eau. Ajouter 10 g de colle de poisson flocon et rajouter 350 mL d'eau. Agiter pendant 15 minutes. Laisser gonfler une heure. Compléter avec de l'eau pour obtenir 1L de solution. Agiter à nouveau 15 minutes. Faire une dilution au 1/5 (un volume de colle pour 5 volumes d'eau), homogénéiser. Incorporer rapidement dans le vin en agitant. Un échantillon de 50 mL de cette solution d'ichtyocolle avec flocons est congelé pour servir de témoin de solution de colle de poisson.

Echantillon de vin collé à l'ichtyocolle avec flocons : C-IF

Dix millilitres de solution d'ichtyocolle avec flocons à 0,2 % sont mélangés en agitant à un litre de Chenin. Quarante millilitres sont prélevés avant collage. Cinq cent millilitres sont prélevés aussitôt après le collage. Le reste de la préparation est stocké pendant 24 h à 20 °C et quatre cent cinquante millilitres en sont retirés et filtrés. Les dix millilitres restant constituent la lie de colle. Ces quatre échantillons sont ensuite congelés puis lyophilisés et enfin stockés à -20 °C.

B- Solution d'ichtyocolle préhydrolysée soluble (IS) à 0,5 %

Délayer 5 g d'ichtyocolles dans 1 litre d'eau. Agiter énergiquement pendant 2 minutes, puis laisser reposer 15 minutes. Agiter à nouveau 2 minutes et laisser reposer 10 minutes. Incorporer ensuite la quantité voulue de solution dans le vin à traiter. Un échantillon de 50 mL de solution d'ichtyocolle préhydrolysée soluble est congelé pour servir de témoin de solution de colle de poisson.

Echantillon de vin collé à l'ichtyocolle préhydrolysée : S-IS

Quatre millilitres de solution d'ichtyocolle soluble à 0,5 % sont mélangés en agitant à un litre de sauvignon. Quarante millilitres sont prélevés avant collage. Cinq cent millilitres sont prélevés aussitôt après le collage. Le reste de la préparation est stocké pendant 24 h à 20 °C et quatre cent cinquante millilitres en sont retirés et filtrés. Les dix millilitres restant constituent la lie de colle. Ces quatre échantillons sont ensuite congelés puis lyophilisés et enfin stockés à -20°C.

3-7-2-3 Collage à l'albumine

Deux albumines d'œuf ont été utilisées:

- Une albumine d'œuf sans lysozyme (AsL)

- Une albumine d'œuf avec lysozyme (AaL)

Les solutions à 2% des deux colles se préparent de façon identique : 2 g d'albumine sont dissous dans 100 mL d'eau. Les solutions sont brassées doucement afin d'éviter la formation de mousse. Chacune des deux solutions est incorporée dans le vin approprié. Un échantillon de 50 mL de chacune des solutions d'albumine (avec ou sans lysozyme) sont conservés à -20°C afin de servir de témoin.

Echantillon de vin collé à l'albumine sans lysozyme : CF- AsL

Cinq millilitres de solution d'albumine sans lysozyme à 2% sont mélangés en agitant à un litre de cabernet franc. Quarante millilitres sont prélevés avant collage. Cinq cent millilitres sont prélevés aussitôt après le collage. Le reste de la préparation est stocké pendant 24 h à 20°C et quatre cent cinquante millilitres en sont retirés et filtrés. Les dix millilitres restant constituent la lie de colle. Ces quatre échantillons sont ensuite congelés puis lyophilisés et enfin stockés à -20°C.

Echantillon de vin collé à l'albumine non délysosymée : CF- AaL

Cinq millilitres de solution d'albumine non délysozymée à 2% sont mélangés en agitant à un litre de cabernet franc. Quarante millilitres sont prélevés avant collage. Cinq cent millilitres sont prélevés aussitôt après le collage. Le reste de la préparation est stocké pendant 24 h à 20°C et quatre cent cinquante millilitres en sont ensuite retirés et filtrés. Les dix millilitres restant constituent la lie de colle. Ces quatre échantillons sont ensuite congelés puis lyophilisés et enfin stockés à - 20°C.

3-8 Préparation des échantillons de vins commercialisés

L'Union des Œnologues collecte des échantillons de vins collés en cave selon les méthodes propres à chaque viticulteur. Les modalités de collage sont les suivantes :

3-8-1 Vin de Bordeaux collé à l'albumine avec lysozyme (AaL)

Six échantillons différents ont été prélevés correspondant aux différentes étapes du collage :

N°1 : témoin vin brut prélevé avant collage

N°2 : surnageant prélevé 3 h après collage

N°3 : surnageant prélevé 3 jours après collage

N°4 : vin prélevé avant filtration moyenne soit 7 jours après collage

N°5 : vin prélevé après deuxième filtration, dite de finition

N°6 : vin prélevé après une troisième filtration, dite de grande finition

3-8-2 Vins collés à la caséine (K)

Ce sont des vins de base provenant de Champagne, collés à la caséine et aux bentonites, issus des millésimes 2001, 2002 et un vin provenant de moût collé avec un mélange bentonite-caséine issu du millésime 2003. Trois échantillons ont été sélectionnés :

N°1 : vin issu du millésime 2003, dont le moût a été traité par un complexe bentonite-caséine

N°2 : vin issu du millésime 2001, traité en 2003 par de la caséine, puis de la bentonite.

N°3 : vin issu du millésime 2002, traité en 2003 par de la caséine, puis de la bentonite

3-8-3 Vins collés à la colle de poisson flocon (IF)

Quatre échantillons ont été utilisés :

N°1 : témoin, vin brut filtré

N°2 : collé : échantillon de surnageant prélevé, en surface, après collage

N°3 : collé : échantillon prélevé en fond de cuve, niveau des lies, après collage

N°4 : vin filtré après collage

Cinquante millilitres de chacun des vins commercialisés, témoins et collés, ont été prélevés, congelés puis lyophilisés et ensuite stockés à - 20°C. Ces lyophilisats seront administrés aux souris soit par injection intrapéritonéale soit par voie orale après un protocole de sensibilisation aux colles œnologiques (AaL, IF, K et K-bentonite).

3-9 Allergénicité des produits de collage / tests de provocation

3-9-1 Les vins collés au laboratoire

La présence de traces des produits de collage dans les vins est évaluée sur les deux souches de souris allergiques C3H et DBA/2 par deux tests de provocation effectués par injection intrapéritonéale de 100 µL de solution de lyophilisat (1 mg de lyophilisat de chaque échantillon de vin à J_{15} et J_{21}). Ces deux tests ont été suivis par un test de provocation par voie orale (gavage gastrique) avec 10 mg de colle pure (tableau 10).

3-9-2 Les vins commercialisés

La présence de traces des produits de collage dans les vins commercialisés sur les deux souches de souris cités précédemment est évaluée par un test de provocation effectué par

injection intrapéritonéale de 100 µL de solution de lyophilisat (1 mg de lyophilisat de chaque échantillon de vin à J_{15}) (tableau 11).

3-10 Caractérisation immunochimique des antigènes/ allergènes

3-10-1 Analyses électrophorétiques des différentes colles

Nous avons choisi d'analyser les protéines de trois types de colle : la colle de poisson flocon, l'albumine avec lysozyme et la caséine. Les électrophorèses sont effectuées dans le laboratoire de l'Environnement et de Chimie Analytique à l'ESPCI, équipe d'Allergie et Environnement. Les protéines sont séparées par électrophorèse en SDS-PAGE, la migration est faite sur un gel constitué d'un gradient de polyacrylamide (8 à 18 %). Une bande du gel est colorée avec le bleu de Coomassie pour révéler les protéines.

3-10-2 Révélation des allergènes avec les sérums : immuno-empreinte

Après électrophorèse, nous avons procédé au transfert électrique des protéines sur une membrane de nitrocellulose (NC). Chaque membrane de nitrocellulose est découpée en bandelette de 3 mm de large. Les bandelettes de membrane (NC) sont saturées avec du tampon PBS BSA 1% tween 0,1% pendant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées avec les sérums de souris et de lapins (les sérums de souris immunisées par la même colle ont été mélangés, il en est de même pour les sérums de lapins) immunisés avec les différentes colles ainsi qu'avec des sérums de patients allergiques au lait de vache, au blanc d'œuf et au poisson, pendant une nuit entière. Lors de cette étape, les anticorps présents dans le sérum et ayant assez d'affinité se fixent sur les protéines antigéniques. Afin de détecter l'endroit où se sont fixés les anticorps, les bandelettes sont lavées (PBS-tween) puis incubées une heure avec des anticorps anti-immunoglobulines (IgE, IgG1, IgG2a, IgG3 et IgGt) marqués à la phosphatase alcaline. Après trois lavages, la révélation s'effectue en ajoutant, un substrat de l'enzyme : NBT-BCIP (H_2O : 4 mL ; tampon phosphatase alcaline : 1 mL ; BCIP : 16,5 µl ; NBT : 33 µl), au bout de 45 minutes, correspondant au temps nécessaire pour obtenir une coloration des anticorps fixés. Les bandes colorées correspondent à la localisation d'un antigène, et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de liaisons antigène/anticorps.

3-10-3 Analyse électrophorétique des protéines contenues dans l'extrait d'arachide et dans la farine de lupin

La farine de lupin et l'extrait d'arachide ont été dissous en milieu basique (bicarbonate de sodium pH 9,4) puis dialysés contre du PBS (Slide-A-Lyser 10K, Pierce). Des mini gels

(Biorad) à 10 % de polyacrylamide (puits de 30 µl) ou à gradient de 4 à 15% (puits de 50 µl) ont été utilisés pour déterminer la composition en protéines. Des échantillons contenant 30 µg de protéines ont été mélangés au tampon de dépôt (Tris HCl 1M, glycerol, SDS et β-mercaptoethanol) et chauffés à 90°C pendant 5 minutes avant d'être déposés dans les puits. Après une heure de migration à 100 mV, les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie. Les images des gels ont ensuite été capturées à l'aide d'un scanner et les distances de migration ont été analysées avec un logiciel d'analyse d'image (Kodak 1D 3.0, Eastman Kodak).

3-11 Statistique

Les différents tests utilisés :

Le seuil de significativité α retenu est 0,05.

Les comparaisons de deux moyennes sont réalisées en moyen d'un test de *t de student.*

Les comparaisons de plusieurs moyennes sont réalisées par l'analyse de variance (ANOVA)

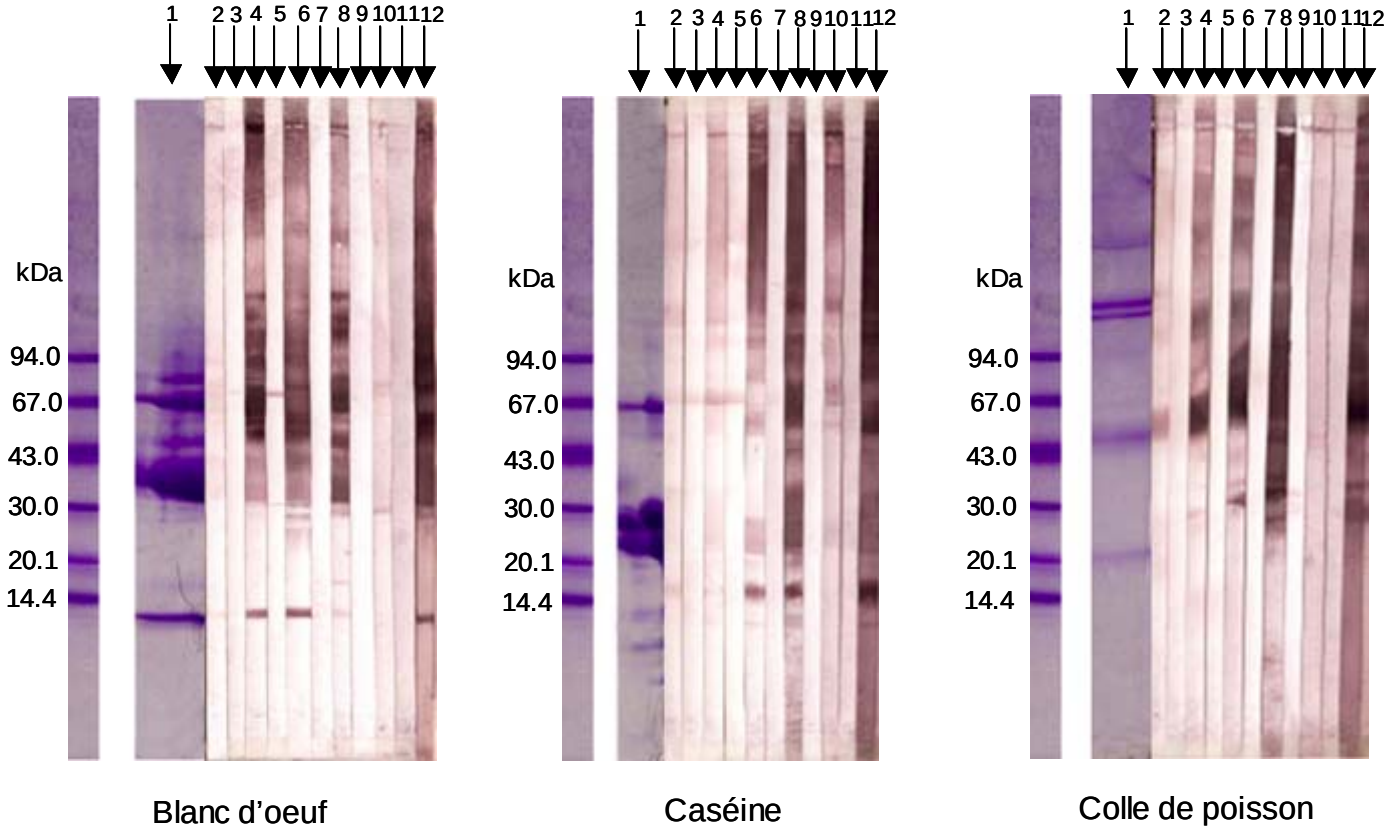

Figure 6 : **Gel d'électrophorèse SDS-PAGE, coloration bleu de Coomassie, suivie d'immunoblot sur la membrane de nitrocellulose avec les trois colles :**
Albumine avec lysozyme, caséine et colle de poisson flocon. A gauche le marqueur de masse moléculaire, **bande 1** : électrophorèse colorée au Bleu de Coomassie, **bande 2** : immuno-détection d'antigènes avec IgG3 de sérum de souris immunisées, **bande 3** : témoin de la bande 2, **bande 4** : immuno-déction d'antigènes avec IgG2a de sérum de souris immunisées, **bande 5** : témoin de la bande 4, **bande 6** : immuno-détection d'antigènes avec IgG1 de sérum de souris immunisées, **bande 7** : témoin de la bande 6, **bande 8** : immuno-détection d'antigènes avec IgG purifiées de lapins immunisés, **bande 9** : témoin de la bande 8, **bande 10** : immuno-détection d'allergènes avec les IgE humaines de sérum de patients allergiques (au blanc d'œuf, au lait de vache et à la caséine), **bande 11** : témoin de la bande 10, **bande 12** : immuno-détection d'antigènes avec IgGt (IgG totales) de sérum de souris immunisées, cette bandelette n'a pas de témoin.

4- RESULTATS ET DISCUSSIONS

4-1 Mise au point d'un modèle de souris allergiques aux différentes colles œnologiques. Recherche de traces de ces colles dans le vin.

4-1-1 Résultats de l'analyse par électrophorèse des protéines contenues dans les différentes colles pures

L'analyse électrophoretique après révélation par le bleu de coomasie, met en évidence les masses moléculaires des bandes protéiques situées entre 8-67 kDa pour la caséine, entre 13-122 kDa pour l'albumine avec lysozyme et entre 20-186 kDa pour la colle de poisson flocon (figure 6, tableau 6).

4-1-2 Résultats de l'immuno-empreinte

Les résultats de l'immuno-empreinte sont donnés dans la figure 6 et le tableau 6.

La caséine

- les IgG sériques spécifiques (IgG1, IgG2a, IgG3 et IgGt) contenues dans les sérums de souris immunisées avec la caséine reconnaissent toutes les bandes protéiques de la caséine colorées par le bleu de Coomassie sauf les bandes 8, 12 et 20 kDa. Néanmoins, elles reconnaissent d'autres bandes protéiques de haut poids moléculaire qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleu de Coomassie (42, 85, 107 et 116 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans les sérums de souris ne reconnaissent aucune bande protéique de la caséine.

- Les IgGt immunopurifiées des lapins immunisés avec la caséine reconnaissent toutes les bandes protéiques de la caséine colorées par le bleu de Coomassie sauf la bande 8 kDa. De plus, elles reconnaissent aussi d'autres bandes protéiques de haut poids moléculaire, qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleu de Coomassie (42, 46, 74, 93, 102 et 130 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans le sérum d'un patient allergique au lait de vache reconnaissent six bandes protéiques, situées entre 22-155 kDa, dont trois bandes visibles avec le bleu de Coomassie (22, 54 et 67 kDa).

A

MM (kDa)	Caséine (Coomassie)	IgE souris	IgGt souris	IgG1 souris	IgG2a souris	IgG3 souris	IgGt lapin	IgE humain (Lait de vache)
155								+
130							+	+
116			+	+	+			
107			+			+		
102				+	+		+	
93							+	
85			+	+				
74							+	+
67	+	-	+	+	+	+	+	+
54	+	-	+	+			+	+
46							+	
42			+				+	
31	+	-	+			+	+	
26	+	-	+				+	
22	+	-		+	+		+	+
20	+	-					+	
18	+	-	+	+			+	
13	+	-	+	+	+	+	+	
12	+	-					+	
11	+	-	+	+	+		+	
8	+	-						

B

MM (kDa)	Albumine (Coomassie)	IgE souris	IgGt souris	IgG1 souris	IgG2a souris	IgG3 souris	IgGt lapin	IgE humain (Œuf)
225			+	+	+		+	
144					+		+	
122	+	-			+		+	
109			+	+	+		+	
93			+	+	+	+		
80	+	-	+	+	+	+	+	+
67	+	-	+		+	+	+	+
60	+	-	+	+	+	+	+	
51	+	-		+	+		+	
41			+	+	+	+	+	
35	+	-	+	+	+	+	+	
31	+	-	+	+			+	+
26	+	-		+			+	
17	+	-					+	
13	+	-	+	+	+	+	+	

C

MM (kDa)	Poisson (Coomassie)	IgE souris	IgGt souris	IgG1 souris	IgG2a souris	IgG3 souris	IgGt lapin	IgE humain (Poisson)
186	+	-	+	+	+			
130	+	-	+	+	+	+	+	
110	+	-	+	+	+	+		
94	+	-		+	+			
77	+	-	+	+	+	+	+	
51	+	-	+	+	+	+		
47							+	
44							+	+
38			+	+	+		+	+
32			+	+			+	
30							+	
20	+		+	+	+		+	+
18		-					+	

Tableau 6: Electrophorèse, après coloration au bleu de coomassie, de la caséine (A), de l'albumine (B) et du poisson (C) et après l'immuno-empreinte avec les sérums de souris et de lapins immunisés avec les trois colles et avec les sérums de patients allergiques au lait de vache, au blanc d'œuf et aux poissons

L'albumine

Les IgG sériques spécifiques (IgG1, IgG2a, IgG3 et IgGt) contenues dans les sérums de souris sensibilisées avec l'albumine reconnaissent toutes les bandes protéiques de l'albumine colorées par le bleu de Comassie sauf la bande 17 kDa. Néanmoins, elles reconnaissent d'autres bandes protéiques de haut poids moléculaire qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleu de Coomassie (41, 93, 109, 144 et 225 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans les sérums de souris ne reconnaissent aucune bande protéique.

- Les IgGt immunopurifiées des lapins immunisés avec l'albumine (AsL) reconnaissent toutes les bandes protéiques de l'albumine. En revanche, elles reconnaissent aussi d'autres bandes protéiques de haut poids moléculaire, qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleu de Coomassie (41, 109, 144 et 225 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans le sérum d'un patient allergique au blanc d'œuf, reconnaissent trois bandes protéiques visibles avec le bleu de Coomassie (31, 67 et 80 kDa)

La colle de poisson flocon

- Les IgG sériques spécifiques (IgG1, IgG2a, IgG3 et IgGt) contenues dans les sérums de souris immunisées avec la colle de poisson flocon reconnaissent toutes les bandes protéiques de la colle de poisson flocon colorées par le bleu de Coomassie. Néanmoins, elles reconnaissent d'autres bandes protéiques qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleue de Coomassie (32 et 38 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans les sérums de souris ne reconnaissent aucune bande protéique de la colle de poisson flocon.

- Les IgGt immunopurifiées des lapins immunisés avec la colle de poisson flocon reconnaissent seulement trois bandes protéiques de la colle de poisson flocon (20, 77 et 130 kDa). En revanche, elles reconnaissent aussi d'autres bandes protéiques, qui ne sont pas mises en évidence par la coloration au bleu de Coomassie (18, 30, 32, 38, 44 et 47 kDa).

- Les IgE spécifiques contenues dans le sérum d'un patient allergique aux poissons (le cabillaud et la morue) reconnaissent très faiblement trois bandes protéiques, situées entre 20-44 kDa, dont une bande visible par la coloration au le bleu de Coomassie (20 kDa).

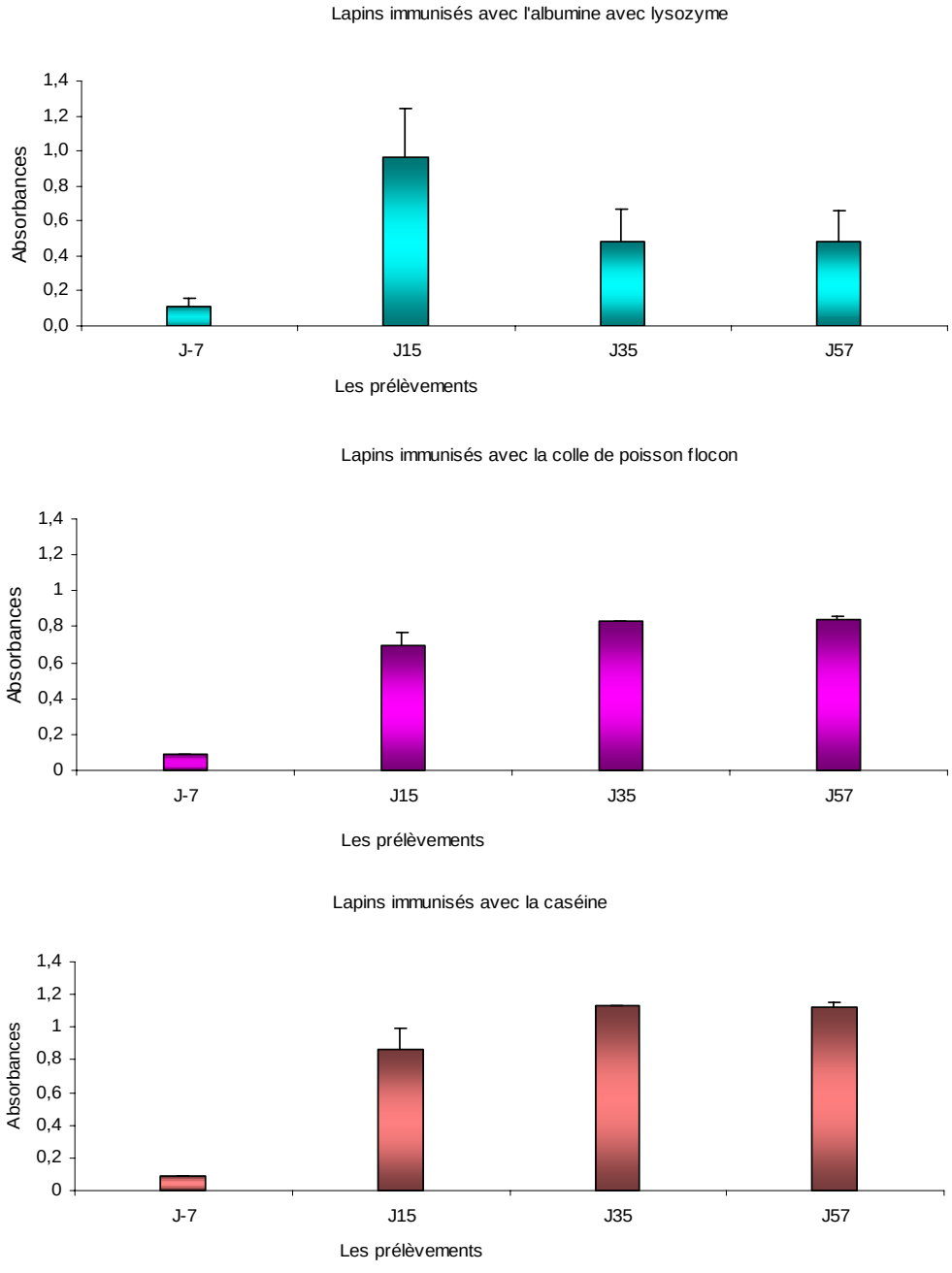

Figure 7: Les niveaux des IgG sériques spécifiques, mesurés à J_{-7}, J_{15}, J_{35} et J_{57}, chez les lapins immunisés par voie i.p avec l'albumine avec lysozyme, la colle de poisson flocon et la caséine

4-1-3 La mise au point de modèles animaux sensibles à l'albumine, à la colle de poisson et à la caséine.

4 -1-3-1 Modèles lapins pour la production d'IgGt spécifiques anti-colles

Des tests ELISA ont été effectués sur les sérums de lapins immunisés soit à l'albumine avec lysozyme, soit à la colle de poisson flocon ou à la caséine pour la révélation des IgGt spécifiques. Les taux des IgGt spécifiques sont importants après la première immunisation (J_{15}) et continuent à augmenter jusqu'à J_{57} pour la colle de poisson flocon et pour la caséine alors qu'ils baissent pour l'albumine avec lysozyme tout en restant significatif (figure 7).

4 -1-3-2 Modèles souris

Cette première étape consiste à produire une ou plusieurs souches de souris allergiques aux colles utilisées dans la clarification des vins. Pour ce faire, nous avons sélectionné, quatre souches de souris C3H, CBA, SJL et DBA/2.

Premier étape : Contrôle de la toxicité des vins avant collage chez les quatre souches de souris sélectionnées. Dans un premier temps, nous avons contrôlé la toxicité des vins avant collage sur les quatre souches choisies pour la mise au point d'un modèle souris sensibles aux différentes colles. Les vins peuvent contenir des substances toxiques pour les souris où même des pseudo-allergènes tels que les amines biogènes qui entraînent des effets comparables à ceux des allergènes. C'est pourquoi avant de mesurer les activités allergéniques des vins après collage, il est nécessaire de s'assurer de la non toxicité des vins témoins avant collage. Les souris des quatre souches (C3H, CBA, SJL et DBA/2) ont reçu une injection de lyophilisat de vin témoin non collé (1 mg dose identique à celle utilisée pour les tests de provocation).

En conclusion : Comme aucune manifestation clinique n'a pu être observée pour chacune des souches, nous pouvons donc les utiliser pour mettre au point un modèle de souris allergique aux différentes colles qui nous servira à mettre en évidence une éventuelle allergénicité des vins commercialisés due à la présence de traces de produits ayant servis au collage.

Deuxième étape : A- Immunisation des souris C3H, CBA et SJL avec les différentes colles

Réponses biologiques : anticorps spécifiques

Un prélèvement retro-orbitaire a été effectué après immunisation à J_{14} sur chacune des souris des trois souches consanguines : C3H, CBA et SJL sensibilisées aux colles pures afin

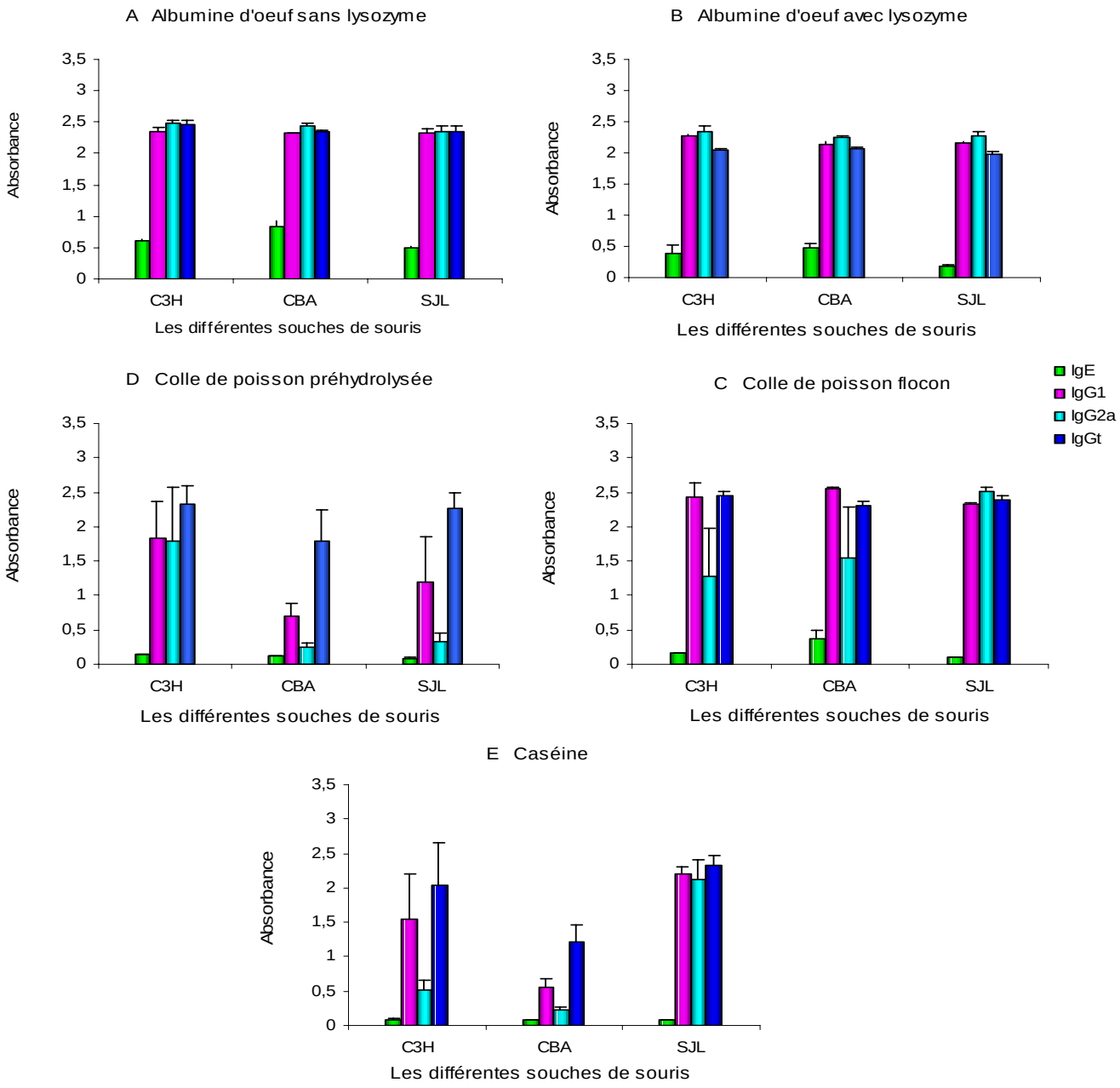

Figure 8 : Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) A : anti-albumine sans lysozyme, B : anti-albumine avec lysozyme, C : anti-colle de poisson flocon, D : anti-colle de poisson préhydrolysée et E : anti-caséine, mesurées à J_{14}, chez les souches C3H, CBA et SJL (n = 3) immunisées avec les différentes colles.

de doser les titres des principales immunoglobulines spécifiques (IgGt, IgE, IgG1 et IgG2a) vis à vis de ces colles. Toutes les souches de souris ont développé des IgG spécifiques (IgGt, IgG1, IgG2a) démontrant l'efficacité du protocole d'immunisation (Figure 8).

Les réponses en IgE spécifiques sont variables en fonction des souches de souris et de l'antigène. Elles restent toujours plus faibles que les réponses en immunoglobulines des autres classes. Les réponses les plus élevées en IgE spécifiques ont été trouvées chez les souches immunisées avec l'albumine avec et sans lysozyme (CBA >C3H >SJL) suivie par celles très inférieures des mêmes souches sensibilisées avec la colle de poisson flocon. En revanche les souches de souris immunisées avec la colle de poisson préhydrolysée et avec la caséine n'ont développé aucune réponse en IgE mesurable (Figures 8 D et E). Nous avons évalué le rapport IgG1/IgG2a, les résultats de ce rapport montrent qu'il est inférieur à 1 pour les trois souches immunisées avec l'albumine avec ou sans lysozyme et supérieur à 1 pour les trois souches immunisées avec les deux colles de poisson et avec la caséine (ainsi que pour la souche DBA/2), à l'exception de la souche SJL pour laquelle il est inférieur à 1 (tableau 7).

Tests de provocation : réponses cliniques

Comme la réponse en IgE est souvent, mais pas toujours, le signe d'une réponse allergique. Ces premiers résultats seront corroborés par un test de provocation pouvant entraîner des signes cliniques voir un choc anaphylactique caractéristique de l'allergie. Les tests de provocation ont été effectués à J_8 et à J_{16} par voie intrapéritonéale avec une dose de 1 mg d'antigène par souris. Les résultats sont donnés dans le tableau 8. Après le premier test de provocation aux différents antigènes (tableau 5A), la souche SJL n'a manifesté aucun signe clinique. La souche C3H a présenté des signes cliniques (stade 3) après administration intrapéritonéale d'albumine sans lysozyme, de la colle de poisson flocon et de la colle de poisson préhydrolysée. La souche CBA a réagi à l'albumine sans lysozyme (stade 3) et à la colle de poisson flocon (stade 2). Les signes cliniques sont essentiellement : hérissement des poils, grattement et frottement du nez et de la tête, abattement, diminution des mouvements respiratoires. Aucun décès n'a été signalé. Aucune souche de souris n'a répondu à la caséine. Après un deuxième test de provocation, toutes les souris de toutes les souches ont répondu aux différents allergènes sauf à la caséine (tableau 8).

Antigènes	Souches de souris	Période	Rapport IgG1/IgG2a
Albumine sans lysozyme (AsL)	C3H	J14	0.94
	CBA	J14	0.93
	SJL	J14	0.98
Albumine avec lysozyme (AaL)	C3H	J14	0.96
	CBA	J14	0.95
	SJL	J14	0.94
Colle de poisson flocon (IF)	C3H	J14	1.88
	CBA	J14	1.23
	SJL	J14	0.92
Colle de poisson préhydrolysée (IS)	C3H	J14	1.02
	CBA	J14	2,07
	SJL	J14	3.63
Caséine (K)	C3H	J14	3.05
	CBA	J14	2.3
	SJL	J14	1.03
	DBA/2	J14	23.73

Tableau 7: Le rapport IgG1/IgG2a chez les différentes souches de souris sensibilisées aux différentes colles pures

Antigènes	Souris	effectif	Stades cliniques après 1er test de provocation ($J_{8)}$	Décès en %	Stade clinique après 2ème test de provocation à J_{16}	Décès en %
Albumine sans lysozyme (AsL)	C3H	3	**3**	0	**4 – 5**	**100%**
	CBA	3	**3**	0	**4**	0
	SJL	3	0	0	**4 – 5**	**33.3%**
Albumine avec lysozyme (AaL)	C3H	3	0	0	**4 – 5**	**66.6%**
	CBA	3	0	0	**3**	0
	SJL	3	0	0	**3**	0
Colle de poisson flocons (IF)	C3H	3	**3**	0	**3**	0
	CBA	3	**2**	0	**3**	0
	SJL	3	0	0	**3**	0
Colle de poisson préhydrolysée (IS)	C3H	3	**3**	0	**3**	0
	CBA	3	0	0	**3**	0
	SJL	3	0	0	**3**	0
Caséine (K)	C3H	3	0	0	0	0
	CBA	3	0	0	0	0
	SJL	3	0	0	0	0
	DBA/2	4	0	0	**4 – 5**	25 %

Tableau 8 : Evaluation des stades cliniques observés à J_8 après le 1er test de provocation ip avec les colles pures (1 mg/ souris), chez les souches C3H, CBA et SJL (n= 3) et la souche DBA/2 (n= 4) immunisées à J_0 avec l'albumine (avec et sans lysozyme), la colle de poisson (flocon et préhydrolysée) et la caséine et à J_{16} après le 2ème test de provocation (i.p) consécutif à une 2ème immunisation à J_{11} chez les mêmes souches de souris

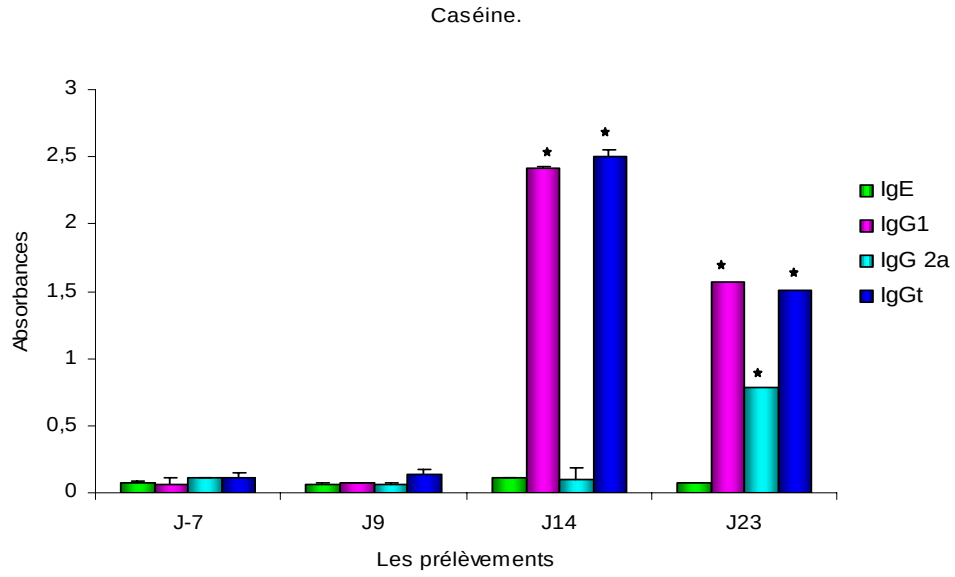

Figure 9: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-caséine mesurées à J_{-7}, J_9, J_{14} et J_{23}, chez les souris de la souche DBA/2 (n= 4)

Antigène	Souches de souris	période	Rapport IgG1/IgG2a
Caséine	DBA/2	J9	1,04
		J14	23,73
		J23	2

Tableau 9 : Le rapport IgG1/IgG2a anti-caséine chez les souris de la souche DBA/2 immunisée avec la caséine

- Les souris de la souche C3H ont présenté des signes cliniques suite au test de provocation à l'albumine avec et sans lysozyme (stade 4-5) et à la colle de poisson flocon et préhydrolysée (stade 3). Nous avons aussi noté 100% de décès suite au choc anaphylactique chez les souris immunisées avec l'albumine sans lysozyme et 66.6 % de mortalité chez les souris immunisées avec l'albumine avec lysozyme.

- Les souris de la souche CBA ont toutes présenté des signes cliniques aux albumines et aux colles de poisson (stade 3) néanmoins aucun cas de décès n'a été noté chez ces souris bien qu'elles présentent les titres les plus élevés en IgE anti-albumine (avec et sans lysozyme) et en IgE anti-colle de poisson flocon.

- Les souris de la souche SJL sensibilisées avec l'albumine sans lysozyme ont présenté des signes cliniques (stade 4-5) et 33.3 % de décès suite du choc anaphylactique. Pour celles sensibilisées avec l'albumine avec lysozyme, avec la colle de poisson flocon et avec la colle de poisson préhydrolysée des signes cliniques (stade 3) moins intenses ont été également observés. Néanmoins, les IgE spécifiques anti-albumine avec lysozyme, anti-colle de poisson flocon et anti-colle de poisson préhydrolysées ne sont quant à elles pas mesurables.

- En ce qui concerne la caséine aucune des trois souches de souris utilisées n'a montré de signes cliniques après les tests de provocation.

B- Immunisation de la souche DBA/2 avec la caséine

Comme les trois souches de souris utilisées dans le protocole précédent n'ont pas répondu à la caséine, la souche DBA/2, a été choisie. Un protocole d'immunisation bien défini a été mis au point afin d'optimiser la production d'immunoglobulines spécifiques (tableau 5A). Les titres des différentes immunoglobulines sont donnés dans la figure 9.

Réponses biologiques : anticorps spécifiques

A J_{14}, les souris développent des taux très élevés d'IgGt et d'IgG1 spécifiques anti-caséine et des taux faibles mais significatifs d'IgE spécifiques. Par contre à J_{23}, on observe une diminution des IgG1, IgGt et IgE spécifiques (figure 9). Alors que, les titres des IgG2a anti-caséine augmentent considérablement. Le rapport IgG1/IgG2a à J_9, J_{14} et J_{23} est supérieur à 1 ce qui est en faveur d'une réponse de type Th2 (tableau 9).

		C3H sensibilisées à				DBA/2 sensibilisées à
		AaL (n=5)	AsL (n=5)	IF (n=5)	IS (n=5)	K (n=5)
		Différents types de vins				
		Cabernet Franc	Cabernet Franc	Chenin	Sauvignon	Chenin
A : 1er test de provocation avec les échantillons de vin lyophilisés (i.p 1mg/souris; J_{15})	Vin non collé	0	0	0	0	0
	Vin collé	0	1	2	1	0
	Lies de colle	2	1	**3**	1	1
	Vin filtré	1	1	1	1	1
A :2ème test de provocation avec les échantillons de vin lyophilisés (i.p 1mg/souris; J_{21})	Vin non collé	0	0	0	0	0
	Vin collé	2	1	0	0	0
	Lies de colle	**3**	2	0	**3**	0 (n=4) 2 (n=1)
	Vin filtré	0	0	0	0	0
B :3ème test de provocation avec les colles pures (10mg/ig/souris/J_{35})		**3**	**3**	1	1	1

Tableau 10: Evaluation, chez les souris sensibilisées, des stades cliniques (0-5) obtenus après les tests de provocation : **A** par voie i.p avec différents échantillons de lyophilisats de vins (cabernet Franc, Chenin, Sauvignon) à J_{15} et J_{21}, **B** par voie orale avec différentes colles pures à J_{35} sur la souche C3H immunisée avec AaL, AsL, IF, IS et la souche DBA/2 immunisée avec K. n = nombre de souris sensibilisées

Tests de provocation à la caséine : réponses cliniques

Le premier test de provocation i.p se révèle négatif alors que le deuxième test de provocation entraîne des signes cliniques (stade 4-5) et 25 % de mortalité (tableau 8).

En conclusion : Nous avons sélectionné dans cette première partie du travail deux souches de souris qui seront utilisées par la suite pour étudier l'allergénicité du vin. La souche C3H qui a réagi aux colles de poisson et aux albumines et la souche DBA/2 qui a réagi aux caséines. Nous avons privilégié la souche C3H plutôt que la souche CBA. Bien que produisant un peu moins d'IgE que les CBA et avec un rapport IgG1/IgG2a <1 et voisin de celui des CBA, les C3H montrent des signes cliniques plus forts allant jusqu'au choc anaphylactique, l'association IgE et choc anaphylactique nous paraissant être plus représentative de la réaction allergique.

4-1-4 Effets des différents échantillons de vins collés au laboratoire sur les C3H et DBA/2 sensibilisées aux différentes colles

Les souris sélectionnées ont été sensibilisées, aux albumines et aux colles de poisson pour les C3H et à la caséine pour les DBA/2, selon le protocole établi pour la mise au point du modèle. Elles ont été soumises à deux tests de provocation par injection i.p de lyophilisats (1mg/souris) de différents vins à J_{15} et J_{21} suivis par un test de provocation par voie orale (gavage gastrique) avec les colles pures (10 mg/souris) à J_{35}.

Réponses biologiques : anticorps spécifiques

Nos résultats sont semblables à ceux que nous avons obtenus lors de la mise au point des modèles. Les C3H ont développés des immunoglobulines spécifiques anti-albumine avec ou sans lysozyme (IgE, IgG1, IgGt et IgG2a). Les réponses IgGt, IgG1 et IgG2a sont supérieures à celles des IgE. Les niveaux de réponses sont très voisins à J_{10} et à J_{20}. Pour les colles de poisson, seule la colle de poisson flocon produit des immunoglobulines spécifiques (IgE, IgG1, IgGt et IgG2a) à J_{20}. En ce qui concerne la caséine, les DBA/2 ont produit des anticorps spécifiques plus importants à J_{20} (Figure 10).

Tests de provocation : réponses cliniques

Les souris (n = 20) sont réparties en quatre groupes de 5 souris. Chaque groupe reçoit un test de provocation (1mg/souris) aux différents échantillons de vin. Le tableau 10 résume les résultats des tests de provocation aux différents échantillons du vin pour les différents groupes.

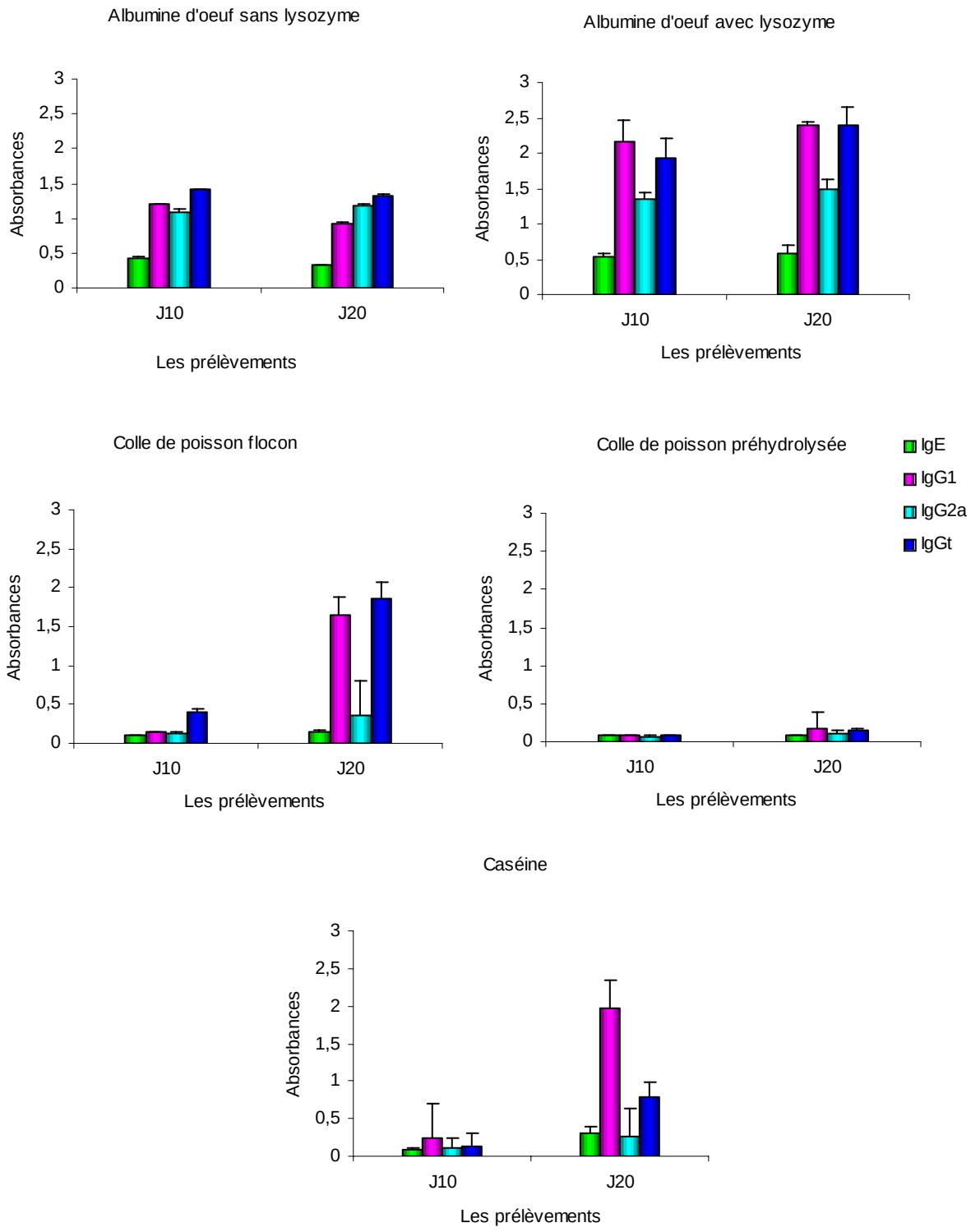

Figure 10 : Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a, IgGt) anti-albumine sans lysozyme, anti-albumine avec lysozyme, anti-colle de poisson flocon, anti-colle de poisson pré-hydrolysée et anti-caséine, mesurés à J_{10} après le protocole d'immunisation avec les colles pures et à J_{20} après le premier test de provocation par voie i.p avec les lyophilisats de vins, chez les souris C3H et DBA/2 (caséine)

A- Tests de provocation par voie i.p aux différents échantillons de vin

1- Avec les vins témoins, aucune réponse clinique n'a été observée chez les C3H et les DBA/2 à J_{15} et à J_{21}.

2- Avec les lies de colle, les réponses cliniques sont plus importantes au premier test de provocation à J_{15}, chez les souris immunisées avec l'albumine avec lysozyme et avec la colle de poisson flocon (stades 2 et 3 respectivement). Au deuxième test de provocation à J_{21} , les réponses cliniques sont plus importantes chez les souris immunisées avec l'albumine avec et sans lysozyme, avec la colle de poisson préhydrolysée et chez une souris de la souche DBA/2 immunisée avec la caséine (stades 3, 2, 3 et 2 respectivement).

3- Avec le vin collé, les réponses cliniques sont variables mais faibles (stade 0 à 2). A J_{21}, seul le vin collé avec l'albumine sans lysozyme produit toujours la même intensité des signes cliniques (stade 1). Pour le vin collé avec l'albumine avec lysozyme, les signes cliniques sont plus importants. Pour les vins collés avec les colles de poisson les manifestations cliniques disparaissent. En ce qui concerne le vin collé avec la caséine, il n'entraîne aucune manifestation clinique à J_{15} et à J_{21}.

4- Avec le vin filtré, les réponses cliniques à J_{15} sont faibles (stade 1). A J_{21}, aucune manifestation clinique n'apparaît quel que soit le produit utilisé pour le collage (tableau 10).

B- Tests de provocation par voie orale aux différentes colles : signes cliniques

La voie intrapéritonéale n'est pas la voie naturelle de consommation. Nous avons voulu savoir si les souris sensibilisées aux différentes colles réagissent à celles-ci lorsqu'elles sont administrées par voie orale. Le test de provocation par voie orale (gavage gastrique avec les colles pures) est effectué après les deux tests de provocation par voie i.p avec les échantillons de vins. Les souris immunisées avec l'albumine avec et sans lysozyme répondent aux tests de provocation par gavage gastrique par des signes cliniques très nets (stade 3, 3 respectivement) et qui se manifestent particulièrement par le gonflement et la congestion très nette de la bouche et des paupières et par la congestion des extrémités digitales et de la queue (tableau 10). En revanche, pour les souris immunisées avec la colle de poisson (flocon et préhydrolysée) et avec la caséine les manifestations cliniques sont très faibles (stade 1).

Souche	Immunisation	Echantillons des vins	Test de provocation à J_{15} (i.p/1mg/souris)
C3H (n= 3)	Albumine avec lysozyme	Vin brut avant collage	0
		Surnageant 3h après collage	2
		Surnageant (3j après collage)	2
		Vin avant filtration moyenne (7j)	1
		Vin après 2 ème filtration : finition	0
		Vin après 3 ème filtration : grande finition	0
	Ichtyocolle flocon	Vin brut filtré	0
		Vin prélevé en fond de cuve après collage	2
		Vin prélevé en surface après collage	1
		Vin filtré après collage	0
DBA/2 (n= 4)	Bentonite-caséine	Vin millésime 2003	0
	Caséine	Vin millésime 2002	0
		Vin millésime 2001	0

Tableau 11: Les signes cliniques après les tests de provocation par voie i.p avec les échantillons des lyophilisats de vins commercialisés.

4-1-5 Effets des différents échantillons de vins commercialisés sur les C3H et DBA/2 sensibilisées avec les colles

Toutes les souris sont immunisées par voie intrapéritonéale en présence d'alun. Les C3H sont réparties en deux groupes, le premier groupe reçoit l'albumine avec lysozyme et le deuxième groupe la colle de poisson flocon. Les souris de la souche DBA/2 sont réparties en deux groupes, le premier groupe reçoit le complexe caséine-bentonite et le deuxième groupe, la caséine soluble.

Tests de provocation par voie i.p aux différents échantillons de vin (Les résultats sont donnés dans le tableau 11).

Albumine avec lysozyme

- Avec l'échantillon de vin témoin, avant collage après test de provocation par voie i.p (1 mg de lyophilisat d'échantillon de vin/ souris) aucune manifestation clinique n'apparaît.

- Avec les échantillons de vins collés avec l'albumine avec lysozyme et après le test de provocation, on voit une évolution dans les manifestations cliniques par rapport à la date du collage et de la filtration (échantillons N° 2, 3 et 4; stades 2, 2 et 1). Celles-ci diminuent au cours du temps. Après la deuxième et la troisième filtration il n'y a plus aucune manifestation clinique (échantillons N° 5 et 6).

Ichtyocolle flocon

- Avec l'échantillon de vin témoin avant collage et après test de provocation, aucune manifestation clinique n'apparaît.

- Avec les échantillons de vin collé avec l'ichtyocolle et après le test de provocation, les manifestations cliniques sont plus importantes avec le prélèvement provenant du fond de cuve qu'avec le prélèvement de surface. Elles disparaissent pour l'échantillon filtré.

Caséine

- Avec tous les échantillons de vins, que ceux- ci proviennent d'un vin traité aussitôt après les vendanges ou après vieillissement, après le test de provocation, aucune manifestation clinique n'apparaît.

4-1-6 Discussion

Le risque d'une réaction anaphylactique suite à la consommation du vin est plutôt rare [142, 143]. Peu de réactions allergiques aux raisins ont été décrites [143]. De plus, il est très difficile d'identifier le(s) constituant(s) responsable(s).

Les allergènes potentiels de vin sont : les constituants du raisin et/ou les produits dérivés de leur fermentation. Parmi ceux-ci nous pouvons distinguer les allergènes vrais et les pseudoallergènes (amines biogènes dont l'histamine). La seconde source potentielle d'allergènes dépend des méthodes de vinification, des matériaux avec lesquels le vin est en contact (fûts, etc), des additifs dont les sulfites et des produits de collage. Ces derniers sont souvent des allergènes majeurs pour l'homme.

Le but de notre étude est de savoir s'il reste dans le vin des résidus allergéniques provenant des produits utilisés pour le collage.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS suivie d'un transfert sur nitrocellulose va nous permettre de caractériser les différentes bandes contenues dans les colles. Les bandes supportant des allergènes sont identifiées à l'aide de sérums humains d'allergiques au lait de vache, à l'œuf et au poisson. Les IgE humaines reconnaissent de 3 à 6 bandes supportant des épitopes allergisants différents selon les colles : 155, 130, 74, 67, 54 et 22 kD pour la caséine, 80, 67 et 31 kD pour l'albumine et 44, 38 et 20 kD pour la colle de poisson (tableau 6). Ces allergènes (sauf la bande de 155 kD de la caséine) sont aussi reconnus par les sérums de lapin immunisés avec les colles qui reconnaissent aussi de nombreuses autres bandes. Ces derniers peuvent donc être utilisés pour mettre au point des tests ELISA de dosage des résidus dans le vin. Utilisés en western blot, ils devraient nous permettre de rechercher dans les vins les protéines allergéniques.

Les IgG de souris sensibilisées reconnaissent également de nombreuses bandes dont les bandes reconnues par les IgE humaines sauf les bandes 130 et 155 de la caséine et la bande 44 kD de la colle de poisson. En revanche les IgE de souris ne reconnaissent aucune bande. Nous avons soit un problème de sensibilité, soit un problème de révélation. Cependant en ELISA les IgE de souris reconnaissent les colles. Dans l'état actuel de nos résultats nous ne pouvons pas dire si les IgE humaines et les IgE murines reconnaissent les mêmes allergènes. La plus grande partie des bandes reconnues par les IgE prennent la coloration au bleu de Coomassie, ce sont donc majoritairement des protéines. Certaines bandes ne

prennent pas cette coloration: soit le western blot est plus sensible que le colorant soit elles ne sont pas constituées majoritairement de protéines.

Dans un premier temps nous avons vérifié l'absence de toxicité des vins avant collage. Pour écarter l'hypothèse d'une pseudoallergie à l'une des composantes des vins, toutes les souches de souris ont reçu une injection de lyophilisat de vin témoin avant collage. On sait que les amines biogènes [144], les sulfites [143], l'alcool éthylique, les divers composants des boissons alcoolisées [145] et l'alcool lui même [146-148] sont les principaux responsables des réactions nocives du vin qui peuvent prêter à confusion avec les réactions allergiques induites par les produits de collage. Aucune manifestation clinique n'a pu être observée pour chacune des souches. Les souches sélectionnées sont donc fiables pour tester les propriétés allergisantes des colles oenologiques. La non toxicité des vins bruts ayant été établie et afin de modéliser les réponses allergiques aux différents produits de collage, plusieurs souches de souris (C3H, CBA, SJL et DBA/2) ont été immunisées avec l'albumine, la colle de poisson et la caséine.

Nous avons réalisé des tests de provocation afin de mettre en évidence les souches qui présentent des manifestations cliniques caractéristiques de l'allergie. Lors de la mise au point des modèles, les souches C3H, CBA et SJL présentent des signes cliniques vis à vis de l'albumine et de la colle de poisson, la souche DBA/2 vis à vis de la caséine.

Les souches de souris C3H (H-2^k), CBA (H-2^k) et SJL (H-2^s), ont toutes développé des immunoglobulines spécifiques d'isotype G (IgG1, IgG2a et IgGt) contre chacune des cinq préparations de colles. Les trois souches ont développé des IgE spécifiques avec l'albumine sans lysozyme. Avec lysozyme la souche SJL se distingue des deux autres en ne produisant pas d'IgE spécifiques. La souche SJL est plutôt considérée comme répondant peu aux allergènes. Il est important de noter que dans notre modèle elle répond mieux (signes biologiques et signes cliniques) à l'albumine en absence de l'autre allergène majeur de l'œuf le lysozyme. Si l'albumine est bien un allergène pour cette souche, nous n'avons pas contrôlé si le lysozyme est également un allergène ou simplement un antigène. Le degré de purification de l'allergène joue un rôle dans le développement de la réponse allergique (sensibilisation et/ou réaction). La production d'IgE est comparable à celle obtenue par Dearman [149, 150] après sensibilisation des souris BALB/c (H-2^b) avec l'albumine, et par notre laboratoire chez la même souche (résultats non publiés, signes cliniques (stade 3)) bien que cette souche ait un phénotype différent de celui des C3H et CBA.

Avec les colles de poisson flocon les trois souches présentent des manifestations cliniques suite aux tests de provocation bien que les IgE spécifiques ne soient pas détectables. Ces résultats sont comparables à ceux publiés par Untersmayr [151]. En effet, dans cette étude, les souris BALB/c recevaient par voie intrapéritonéale du caviar et produisaient des niveaux élevés d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques mais pas d'IgE spécifiques et montraient des signes cliniques d'allergie (tests de provocation et tests cutanés positifs).

Seule la souche DBA/2 a produit des IgE anti-caséine. Ce dernier résultat conforte celui similaire publié par Ito [3] qui suite à une sensibilisation par voie orale (gavage gastrique) avec la caséine chez trois souches de souris (DBA/2, BALB/c et B10A) montre que seule la souche DBA/2 produit des IgE spécifiques anti-caséine. En revanche, cet auteur n'a pas recherché les manifestations cliniques suite à un test de provocation. Notre étude nous permet de conclure que cette souche est bien allergique à la caséine. C'est pourquoi nous l'avons retenue pour l'étude de l'allergénicité des vins collés à la caséine.

Pour affiner ces résultats, nous avons évalué le rapport IgG1/IgG2a spécifiques. D'après Mosmann et Coffman [2], quand ce rapport est élevé, il traduit une réponse de type Th2 alors que lorsqu'il est bas, la réponse est de type Th1. Dans notre travail ce rapport, contrairement aux données de la littérature, n'est pas corrélé aux réponses IgE, bien que l'allergie soit une réponse immune de type Th2 prédominant. Nos résultats sont évalués à partir des mesures d'absorbance, l'absorbance étant un compromis entre la concentration et l'avidité. Cette dernière est elle-même un compromis puisqu'elle mesure une moyenne de constantes d'affinité. Du point de vue biologique, ce sont les affinités qui sont importantes : pour qu'un anticorps déclenche une réaction son affinité doit être supérieure à un seuil que souvent nous ne connaissons pas. Le rapport aurait une signification si nous le calculions à partir des absorbances des anticorps ayant l'affinité nécessaire pour déclencher la réaction biologique. Cependant ce rapport nous permet de comparer les réponses moyennes spécifiques en IgG1 et IgG2a. Nous pouvons constater que les réponses IgG2a spécifiques sont importantes avec l'albumine, moyennes avec la colle de poisson et faibles avec la caséine. La composante Th1 apparaît plus importante pour l'albumine que pour la caséine. L'ensemble de ces mesures biologiques montre l'importance des signes cliniques pour confirmer que nos souches sont bien allergiques.

Pour notre étude nous avons retenu la souche C3H pour le blanc d'œuf et la colle de poisson. Les signes cliniques sont plus importants chez les C3H bien que les taux d'IgE

spécifiques soient supérieurs pour la souche CBA par rapport à la souche C3H. à partir de ces résultats, nous pouvons conclure de ces résultats, qu'il existe bien un effet dépendant de la souche, qu'il est important de déterminer, afin de mieux comprendre l'allergénicité des protéines alimentaires et les mécanismes qui la régissent.

La reproductibilité des modèles a été vérifiée et confirmée au cours des séries expérimentales. Les dosages immunologiques (IgE spécifiques) montrent bien que les souris C3H et DBA/2 réagissent avec les colles œnologiques et confirment l'efficacité du protocole de sensibilisation ainsi qu'en témoignent les signes cliniques (figure 10, tableau 10).

Les premiers tests d'allergénicité des vins ont été faits à partir de lyophilisats des vins collés au laboratoire. Les résultats sont logiques : les réponses cliniques sont plus nettes à J_{21}. En effet, les lyophilisats de vins avant collage ne provoquent pas de signes cliniques, les lyophilisats de vins collés à l'albumine (AaL et AsL) provoquent des signes cliniques intermédiaires (stade 2 et 1 respectivement). En revanche les lyophilisats de lies de trois colles entraînent les signes cliniques marqués (stade 3, 2 et 3 respectivement pour AaL, AsL et IS). Avec les lyophilisats de vins filtrés, tous les signes cliniques disparaissent. La filtration se montre donc efficace pour l'élimination des résidus des produits de collage. Ainsi nos modèles sont utilisables pour l'étude des vins commercialisés.

Puisque le vin est naturellement consommé par voie orale, nous avons analysé les manifestations cliniques présentes chez les animaux soumis aux tests de provocation par gavage gastrique avec les colles pures et après le deuxième challenge par voie ip. Les doses de colles administrées par gavage gastrique sont importantes comme le montre le tableau 10. Des doses physiologiques pourraient provoquer des réponses plus faibles. Les signes cliniques observés sont plus importants avec les albumines (stade 3) quel que soit l'échantillon de vin utilisé. Ils sont plus faibles (stade 1) pour les autres produits de collage (IF, IS et K). Ces manifestations cliniques sont, cependant, moins importantes que lorsque le test de provocation est fait par voie i.p (stade 4), et pour l'albumine, elles touchent plus intensément le tissu cutané. Par gavage gastrique, les souris sensibilisées aux albumines sont plus réactives que les souris immunisées aux ichtyocolles et à la caséine. Ceci peut s'expliquer par la résistance de certaines protéines à la digestion et qui de ce fait sont potentiellement allergéniques. En effet, les allergènes alimentaires sont considérés comme étant stables pendant les différentes étapes de la digestion [152]. Dans notre travail, au cours

des tests de provocation par gavage gastrique et avec de fortes doses d'albumine, on peut émettre l'hypothèse que le rapport pepsine/protéines est fortement modifié. Ceci peut entraîner une altération de la digestion de l'albumine et la formation de fragments protéolytiques qui garderaient le potentiel allergénique important de la protéine [153, 154]. En revanche, en ce qui concerne les ichtyocolles, nous avons noté des manifestations cliniques de faible amplitude (stade 1) chez les souris C3H, sensibilisées à la colle de poisson flocon et à la colle de poisson préhydrolysée, après un challenge oral. La parvalbumine (Gad c 1 : 11 kD), allergène majeur du poisson, a toujours été considérée comme étant résistante à la digestion. Néanmoins, Untersmayr et son équipe [155] ont démontré que cette protéine ainsi que les protéines du caviar (30, 84, 100 et 118 kD), consommées par voie orale chez la souris, sont immédiatement dégradées pendant la digestion gastrique et perdent leur potentiel allergénique. Ainsi, la digestion expliquerait le potentiel allergénique réduit des ichtyocolles au cours de notre challenge par gavage gastrique. Il en est de même pour la caséine (manifestations cliniques stade 1) qui est rapidement dégradée au pH gastrique normal [156].

Pour tester les préparations commerciales, nous avons sensibilisé les souris C3H à l'albumine avec lysozyme et à la colle de poisson flocon et les souris DBA/2 à la caséine et à la caséine bentonite. Les réponses aux tests de provocation par injection par voie intrapéritonéale de lyophilisats de vins commercialisés montrent des variations en fonction du vieillissement des vins par rapport au collage et à la filtration.

Pour le groupe immunisé avec l'albumine avec lysozyme, nous avons noté qu'après le collage les manifestations cliniques diminuaient en fonction du temps. Après la troisième filtration, ces symptômes disparaissent complètement. Les témoins négatifs sont conformes aux résultats attendus. On peut conclure que les filtrations sont efficaces pour éliminer les résidus de blanc d'œuf. Ceci confirme les résultats trouvés à partir des vins collés au laboratoire.

Pour le groupe immunisé à la colle de poisson flocon des signes cliniques observés après les tests de provocations sont plus importants dans le prélèvement de fond de cuve que dans les prélèvements en surface. Ces deux échantillons de vin contiennent encore les allergènes de la colle de poisson mais vraisemblablement à une concentration différente montrant un effet du à la décantation. L'échantillon de vin filtré après collage, ne provoque aucun signe clinique : la filtration a éliminé les résidus allergéniques.

Pour le groupe immunisé à la caséine, nous avons remarqué, que les préparations commerciales n'induisent pas de signes cliniques. Ces préparations proviennent des millésimes 2001, 2002 et 2003. Soit le traitement soit le vieillissement et la maturation ont éliminé toute trace d'allergène. Ces résultats sont identiques à ceux observés avec les vins traités au laboratoire.

Au vu de ces résultats, la filtration est donc une étape cruciale dans l'élimination des allergènes. Le risque d'une réaction allergique à la suite d'une consommation de vin collé existe. Des résidus d'allergènes peuvent persister dans le vin selon l'allergène et le traitement. Cependant, la filtration, la maturation et le vieillissement jouent un rôle primordial dans l'élimination de ces résidus. Notre modèle animal peut participer au contrôle de l'efficacité des méthodes de décantation/filtration et aider à définir un protocole permettant l'élimination des résidus de collage dans les vins.

Extrait d'arachide	Lupin blanc
80.2	76.6
76	65.4
50.5	59.3
48.6	53.7
46.1	51.2
32.7	47.2
25.1	45.8
21.8	42.6
18.9	40.6
	36.9
	33.8
	29.3
	25.7
	22.1
	19.4

Tableau 12 : Les bandes protéiques (kD) des protéines d'arachide et du lupin obtenues par électrophorèse (SDS)

Souches	Prélèvements	IgE	IgG1	IgG2a	IgGt	IgG1/IgG2a
C3H (n= 10)	J_{-7}	0.05 *0.003*	0.43 *0.22*	0.11 *0.04*	0.22 *0.15*	-
	J_{15}	0.35 * *0.21*	2.07 * *0.36*	1.44 * *1*	1.55 * *0.46*	1.43
	J_{30}	0.19 * *0.06*	1.82 * *0.29*	1.29 * *0.47*	2.15 * *0.19*	1.40
	J_{45}	0.16 * *0.1*	1.85 * *0.26*	1.41 * *0.49*	1.52 * *0.24*	1.31
CBA (n= 10)	J_{-7}	0.05 *0.005*	0.12 *0.06*	0.19 *0.1*	0.11 *0.02*	-
	J_{15}	0.78 * *0.2*	1.93 * *0.56*	0.65 * *0.37*	1.8 * *0.52*	2.95
	J_{30}	0.27 * *0.05*	2.14 * *0.1*	0.74 * *0.46*	1.83 * *0.25*	2.89
	J_{45}	0.46 * *0.13*	1.89 * *0.26*	0.73 * *0.64*	1.27 * *0.41*	2.54
BALB/c (n= 10)	J_{-7}	0.05 *0.02*	0.21 *0.1*	0.14 *0.04*	0.1 *0.03*	-
	J_{15}	0.34 * *0.15*	1.83 * *0.4*	0.78 * *0.62*	1.42 * *0.311*	2.36
	J_{30}	0.26 * *0.04*	2 * *0.18*	1.39 * *0.29*	2 * *0.18*	1.44
	J_{45}	0.3 * *0.11*	1.81 * *0.1*	1.86 * *0.83*	1.67 * *0.16*	0.97
SJL (n= 10)	J_{-7}	0.05 *0.003*	0.1 *0.01*	0.1 *0.007*	0.08 *0.01*	-
	J_{15}	0.06 *0.003*	1.79 * *0.48*	0.76 * *0.5*	2.07 *0.32*	2.33
	J_{30}	0.1 * *0.01*	1.73 * *0.4*	0.55 * *0.37*	1.71 * *0.22*	3.10
	J_{45}	0.07 *0.01*	1.66 * *0.47*	0.62 * *0.24*	1.38 * *0.32*	2.69

Tableau 13: Moyennes et écarts types des densités optiques (DO) pour les différents isotypes à spécificité anti-arachide pour chaque souche de souris à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45} (dilution des sérums: 1.10^{-5} sauf dosages IgE :1.10^{-1}. Rapport IgG1/IgG2a à J_{15}, J_{30} et J_{45}

4-2 Mise au point d'un modèle de souris allergique à l'arachide pour étudier les réactions allergiques croisées entre l'arachide et le lupin

4-2-1 Contenu en protéines de la préparation d'arachide

Cent grammes d'arachide après traitements successifs à l'acétone et au diethyl éther, suivis d'une lyophilisation donnent 2,23 g de poudre contenant 691 mg de protéines hydrosolubles soit un rendement en protéine 2,23 %. En conclusion, à partir de 100 g de graines d'arachide nous avons obtenu 690 mg de protéines d'arachide hydrosolubles soit un rendement en protéines de 0,69 %.

4-2-2 Contenu en protéines de la farine du lupin

Une quantité connue de farine de lupin blanc (LB) est dissoute dans du PBS. La quantité de protéines extraite est exprimée en pourcentage de la quantité de farine dissoute. Le rendement en protéines après dissolution du LB est de 33,7 %.

4-2-3 L'analyse électrophorétique de la farine de lupin et de l'extrait d'arachide

Le tableau 12 présente les poids moléculaires des protéines révélées après dissolution des deux produits en milieu basique. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 12.

4-2-4 Modèle de souris sensibilisés à l'arachide

4-2-4-1 Sensibilisation des différentes souches de souris à l'arachide par voie intra-péritonéale.

Les souris des quatre souches C3H, CBA, BALB/c et SJL ont été immunisées avec 10 µg d'extrait d'arachide par souris, en présence d'alun comme adjuvant. Nous avons mesuré les titres en anticorps spécifiques sériques (IgE, IgG totales, IgG1 et IgG2a) avant et après sensibilisation (J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45}).

Réponses biologiques : anticorps spécifiques anti-arachide

Toutes les souches de souris (C3H, CBA, SJL et BALB/c) ont répondu en produisant des anticorps anti-arachide de différents isotypes IgG (IgGt, IgG1 et IgG2a) et IgE démontrant l'efficacité du protocole d'immunisation. Seule la souche SJL ne répond pas en IgE (tableau 13, figure 11). Les réponses IgE spécifiques anti-arachide sont variables selon les souches. Les meilleures réponses IgE (intensité de la réponse et nombre d'animaux positifs) ont été retrouvées pour les CBA (H-2^k) suivie par les BALB/c (H-2^d) puis les C3H (H-2^k). Par contre, les souris SJL (H-2^s) n'ont développé aucune réponse de type IgE (tableau13; figure

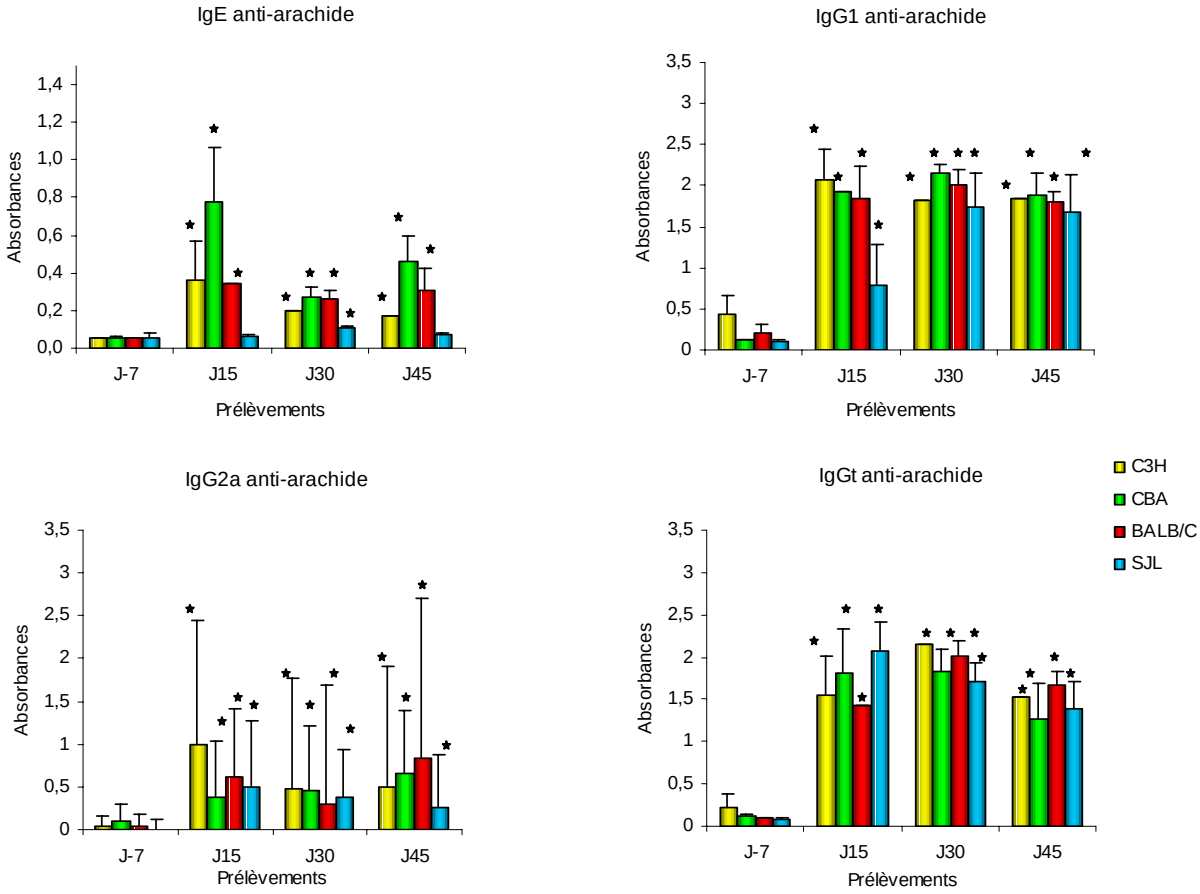

Figure 11: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide, mesurées à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45},chez les souris des souches C3H, CBA, Balb/c et SJL (n= 10) immunisées par voie i.p avec l'extrait d'arachide en présence d'alun

Souches de souris	J_{15}	J_{30}	J_{45}
C3H	**8/10**	**10/10**	**7/10**
BALB/c	**9/10**	**10/10**	**9/10**
CBA	**10/10**	**10/10**	**10/10**
SJL	0/10	1/10	0/10

Tableau 14: Nombre de souris dont le sérum est positif en IgE anti-arachide.

Antigène d'immunisation	Souches	Evaluation des signes cliniques après i.p arachide	Décès par choc anaphylactique
Arachide	C3H Témoin	Stade 0	0 %
	C3H	Stade 4 (100 % des souris)	80 %
	CBA	Stade 4 (100 % des souris)	20 %
	BALB/c	Stade 0	0 %
	SJL	Stade 0	0 %

Tableau 15: Les tests de provocation par voie i.p avec l'extrait d'arachide. Evolution des signes cliniques et pourcentage de décès de souris ayant présenté des signes cliniques

11). Les réponses en IgE spécifiques anti-arachide augmentent après le premier rappel à J_{10} et diminuent plus ou moins au cours du temps, malgré les rappels (tableau 13). Une variabilité individuelle a été observée dans les réponses au sein d'une même souche de souris. Le nombre maximum de souris qui expriment des IgE sériques spécifiques est observé à J_{30} après le 1er rappel (tableau 14). Comme le montre la figure 11, la densité optique (DO) observée pour la souche de souris SJL dont une seule souris possède un sérum positif en IgE anti-arachide à J_{30}, se situe au-dessus du seuil de détection.

Comme le démontre la figure 11, les IgG1, IgG2a et IgGt spécifiques sont fortement induites après le premier rappel. Quarante cinq jours après sensibilisation, les DO commencent à baisser mais restent largement supérieures au niveau basal. Le rapport IgG1/IgG2a est supérieur à 1 pour toutes les souches, indiquant des réponses de type Th2 dominants (tableau 13), les réponses les plus forte étant produites par les CBA et SJL bien que cette dernière ne produit pas d'IgE spécifiques. Toutes les souches fortes répondeuses en IgE présentent un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 1 (tableau 13). Au vu de ces résultats, les souches CBA et BALB/c sont les souches qui présentent les meilleures réponses biologiques. Pour ces souches le nombre de souris qui répondent en IgE spécifiques anti-arachide est d'emblée le plus important et le reste au cours du temps (tableau 14). Une variabilité plus importante entre les souches est observée pour les IgG2a et les IgE spécifiques par rapport aux IgGt et IgG1 spécifiques.

Réponses cliniques : tests de provocation avec l'extrait d'arachide chez les souris immunisées contre l'arachide

La signification biologique des anticorps est évaluée par la mesure des réponses aux tests de provocation après injection d'1 mg d'extrait d'arachide (soit 6,9 μg de protéine d'arachide) (tableau 15). Dans les 10 minutes qui suivent l'injection, toutes les souris des souches C3H et CBA ont présenté des signes cliniques de réaction allergique (stade 4). Chez ces deux souches, nous avons noté 80% de mortalité chez les C3H et 20% de mortalité chez les CBA. Toutes les souris des autres souches (BALB/c et SJL) n'ont montré aucun signe clinique. En conclusion, les souches C3H et CBA ont la même réponse élevée, 100% de signes cliniques, en revanche, la souche C3H montre une meilleure réponse allergique : 80% de mortalité contre 20% chez la souche CBA.

Souches de souris	J_{15}	J_{30}	J_{45}
C3H	0/10	**4/10**	**5/10**
BALB/c	0/10	0/10	**2/10**
CBA	0/10	**3/10**	**7/10**
SJL	0/10	0/10	0/10

Tableau 16: Nombre de souris dont le sérum contient des IgE à activité spécifique anti-lupin

Souches	Prélèvements	IgE	IgG1	IgG2a	IgGT	IgG1/IgG2a
C3H (n= 10)	J_{-7}	0.07 *0.0009*	0.13 *0.06*	0.11 *0.006*	0.09 *0.009*	-
	J_{15}	0.09 0.004	0.46 *0.19*	0.11 *0.01*	0.15 *0.04*	2.05
	J_{30}	0.11 *0.03*	1.22 * *0.14*	0.32 * *0.25*	1.07 * *0.49*	3.76
	J_{45}	0.13 * *0.06*	2.13 * *0.34*	0.69 * *0.53*	1.64 * *0.4*	3.10
CBA (n= 10)	J_{-7}	0.09 *0.0009*	0.11 *0.005*	0.11 *0.006*	0.09 *0.004*	-
	J_{15}	0.07 *0.01*	0.17 *0.1*	0.11 *0.01*	0.09 *0.01*	0.65
	J_{30}	0.1 *0.03*	0.71 * *0.59*	0.23 *0.2*	0.56 * *0.43*	1.27
	J_{45}	0.14 * *0.05*	1.06 * *0.84*	0.2 *0.16*	0.61 * *0.47*	1.62
BALB/c (n= 10)	J_{-7}	0.09 *0.0009*	0.1 *0.007*	0.11 *0.08*	0.08 *0.005*	-
	J_{15}	0.11 *0.007*	0.12 * *0.01*	0.18 *0.24*	0.1 *0.03*	1.53
	J_{30}	0.08 *0.01*	0.36 * *0.33*	0.28 *0.38*	0.21 * *0.14*	3.00
	J_{45}	0.1 *0.04*	0.65 * *0.43*	0.4 *0.51*	0.43 * *0.26*	5.20
SJL (n= 10)	J_{-7}	0.07 *0.003*	0.11 *0.01*	0.11 *0.03*	0.12 *0.01*	-
	J_{15}	0.07 *0.003*	0.48 * *0.48*	0.14 *0.12*	0.35 *0.36*	3.26
	J_{30}	0.07 *0.006*	1.07 * *0.57*	0.38 *0.59*	0.44 * *0.63*	2.81
	J_{45}	0.07 *0.006*	1.61 * *0.69*	0.77 * *0.7*	1.3 * *0.52*	2.09

Tableau 17: Moyennes et écarts types des densités optiques (DO) pour les différents isotypes à spécificité anti-lupin pour chaque souche de souris immunisées avec l'extrait d'arachide par voie i.p en présence d'alun à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45} (dilution des sérums: 4.10^{-2} sauf dosages IgE: 1.10^{-1}) Rapport IgG1/IgG2a à J_{15}, J_{30} et J_{45}

4-2-5 Réactions croisées in vitro anti-lupin des souris immunisées à l'arachide

Une fois le modèle de souris allergique à l'arachide établi, nous avons recherché si les anticorps anti-arachide étaient susceptibles de reconnaître le lupin. Pour cela les sérums de souris (C3H, CBA, SJL et BALB/c) immunisées à l'arachide (n=10) ont été analysés *in vitro* afin de tester leur capacité à réagir avec le lupin.

Réponses biologiques : anticorps sériques IgG et IgE anti-arachide qui croisent avec le lupin

La recherche de réactions croisées, montre que les souris immunisées avec l'arachide reconnaissent certains épitopes de la farine de lupin blanc doux (tableaux 16 et 17). Les titres en IgE anti-arachide, qui croisent avec le lupin, présents dans les sérums de souris immunisées à l'arachide sont faibles (C3H, CBA et BALB/c). La souche SJL n'a pas d'IgE anti-arachide qui croisent avec le lupin (tableau 17). Ainsi, les sérums contenant des IgE anti-arachide présentent des réactions croisées avec le lupin blanc. Pour les IgE, la dilution sérique utilisée pour les deux tests arachide et lupin est la même : 1/10. Les titres des IgE mesurés avec la farine de lupin sont plus faibles que les titres des IgE mesurées avec l'arachide. L'apparition des IgE spécifiques anti-arachide qui reconnaissent la farine de lupin est plus tardive (J_{45}) que l'apparition des IgE anti-arachide (J_{15}) et leur augmentation est plus faible au cours du temps (figure 12). Pour deux souches (C3H et CBA) sur quatre, la réaction croisée est significativement mesurable. La souche BALB/c bien qu'ayant des d'IgE anti-arachide ne présente pas de réaction croisée avec le lupin (tableau 17). Si nous tenons compte des réponses individuelles nous constatons que 50% des souris C3H et 70% des souris CBA présentent une réaction croisée (tableau 16).

Pour le dosage des activités IgGt anti-arachide qui croisent avec le lupin, les titres sont nettement plus faibles que celles des IgGt anti-arachide (tableau 17, figure 12). La dilution sérique utilisée pour les mesures est de 4.10^{-2} (farine de lupin) au lieu de 1.10^{-5} (extraits d'arachide). Les différentes souches montrent à J_{45} des niveaux très important d'IgG1 et d'IgGt anti-arachide qui croisent avec le lupin (C3H > SJL > CBA> BALB/c). Quant aux IgG2a anti-arachide qui croisent avec le lupin, les absorbances rapportées sont maximales à J_{45} (SJL> C3H> BALB/c > CBA). L'étude des rapports IgG1/IgG2a anti-arachide qui croisent avec le lupin montre que ces rapports sont globalement élevés de la même manière que les rapports IgG1/IgG2a anti-arachide (tableau 16). Si nous tenons compte des résultats obtenus in vitro, les souches CBA et C3H apparaissent comme les meilleurs modèles pour étudier les réactions croisées archide-lupin.

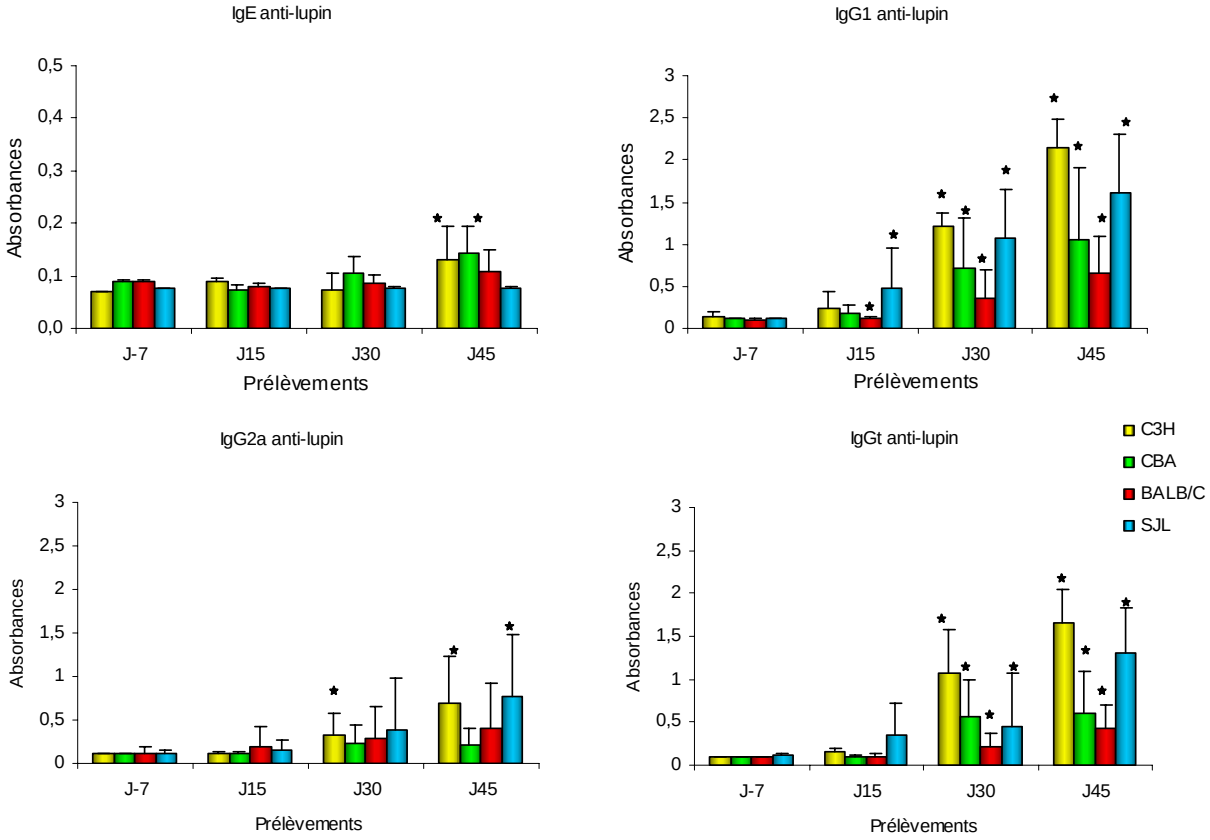

Figure 12: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide qui reconnaissent la farine de lupin, mesurées à J_{-7}, J_{15}, J_{30} et J_{45}, chez les souris des souches C3H, CBA, Balb/c et SJL (n= 10) immunisées par voie i.p avec l'extrait d'arachide en présence d'alun

Réponses cliniques aux tests de provocation avec la farine de lupin chez les souris sensibilisées à l'arachide

Après les tests de provocation au lupin chez les souris sensibilisées à l'arachide, aucune des 4 souches n'a montré de signes cliniques, après l'injection intrapéritonéale (1 mg /souris) de farine de lupin.

4-2-6 Discussions

A la suite de l'étude de Moneret-Vautrin décrivant chez l'homme une réaction croisée entre l'arachide et les autres légumineuses dont le lupin [45], nous avons étudié les relations entre la réaction croisée *in vitro* arachide/lupin et les manifestations cliniques provoquées par un challenge au lupin chez les souris immunisées avec l'extrait d'arachide. Ceci a pour but de comprendre les mécanismes responsables de cette allergie croisée. Pour cela nous avons choisi la souris, comme modèle d'étude, car elle est caractérisée par un complexe majeur d'histocompatibilité relativement proche de celui de l'homme et par une balance Th1/Th2 plus nette et plus facile à mettre en évidence que chez l'homme [157]. Les IgE, les IgG1 et les IgG2a spécifiques, sont le reflet des réponses allergiques et immunitaires induites chez la souris : réponse de type Th2 associée à la production d'IgG1 et d'IgE versus réponse de type Th1 caractérisée par la production d'IgG2a. Le rapport IgG1/IgG2a est à utiliser avec précaution comme nous l'avons remarqué dans la mise au point des modèles de souris allergiques aux colles oenologiques. De plus, même si la balance est en faveur des Th2 il n'y a pas forcement allergie. Les paramètres retenus pour la validation de notre modèle animal reposent sur la production d'immunoglobulines spécifiques (IgE et IgG1) mais aussi sur les signes cliniques observés après un challenge allergénique.

Les réactions allergiques peuvent être liées à des facteurs génétiques (CMH: complexe majeur d'histocompatibilité) et environnementaux. Chaque souche possède un phénotype spécifique qui est co-responsable de sa forte ou faible réponse à un allergène spécifique. Plusieurs études ont montré que la réponse de certaines souches de souris sensibilisées avec l'extrait d'arachide est sous le contrôle du système CMH [137, 158].

En nous basant sur les données de la littérature, nous avons utilisé quatre souches de souris (C3H, CBA, BALB/c et SJL) afin de sélectionner notre modèle. Nous avons trouvé que les trois souches C3H (H-2^k), CBA (H-2^k) et BALB/c (H-2^d) répondent en IgE et IgG1 spécifiques mais seules les souches C3H et CBA qui présentent des signes cliniques, sont réellement allergiques à l'arachide. En revanche la souche BALB/c (H-2^d) présente

uniquement des signes biologiques. La souche SJL (H-2^s) ne présente ni signe biologique ni signe clinique. Nos résultats recoupent partiellement ceux de Li [158] qui suite à une sensibilisation par un allergène de l'arachide (pDNA par voie intramusculaire) chez trois souches de souris différentes (C3H: H-2^k, BALB/c : H-2^d, AKR /J : H-2^k) a montré que seule la souche C3H produisait des signes biologiques, alors que la souche AKR/J n'en produisait pas même si elle porte le même phénotype. L'haplotype H-2 n'est donc pas le seul composant déterminant de la réponse immunologique à un antigène chez la souris. Cependant, nos conditions expérimentales ne sont pas identiques et en particulier l'antigène est différent. Lucas et al [159] dans une étude portant sur la réaction immune systémique de la souris à un autre allergène, la PLA_2 (phospholipase A_2 : allergène majeur du venin d'abeille), a montré que la sécrétion d'anticorps anti-PLA_2 était dépendante du système H-2. Les animaux présentant un allèle *b* ou *f* dans la région A du complexe H-2 étaient de faibles répondeurs, tandis que ceux ayant un allèle *d*, *k*, *q*, ou *s* étaient de forts répondeurs.

De nombreuses publications ont montré que les IgE sont sous la dépendance des réponses immunes de type Th2 chez l'homme [160] et chez l'animal [161, 162]. Toutefois, chez la souris, des études récentes ont montré que la réponse spécifique à un antigène ne dépend pas seulement des IgE. En effet, Oettgen et son équipe [163] ont démontré dans plusieurs études que la réaction d'hypersensibilité peut être déclenchée non seulement par les IgE spécifiques, mais aussi par les IgG1 spécifiques. D'autres équipes ont confirmé que l'hypersensibilité immédiate peut être exprimée par les isotypes d'immunoglobulines spécifiques de l'allergène : IgG1 et IgE et non par les isotypes IgG2a et IgG3 spécifiques [135, 164]. Ces résultats s'accordent avec les nôtres puisque les C3H et les CBA qui produisent des IgE et des IgG1 spécifique anti-arachide présentent elles aussi des manifestations cliniques suite à un challenge intrapéritonéale avec l'extrait d'arachide. En revanche, les BALB/c qui produisent des IgE et des IgG1 spécifiques ne sont pas allergiques. Il en est de même pour les SJL qui ont des IgG1 spécifiques. Les relations entre isotypes spécifiques et anaphylaxie chez la souris sont donc complexes. Ces résultats montrent l'importance des signes cliniques dans l'appréciation du diagnostic de l'allergie.

Ces observations nous ont permis de considérer les deux souches BALB/c et SJL comme étant des souches non allergiques à l'arachide et suggèrent que toutes les réponses de type Th2 prédominant ne sont pas obligatoirement des réponses allergiques. Notre étude indique que les souris C3H et CBA représentent un modèle valable pour l'étude des

réactions allergiques à l'arachide et sont capables de développer des IgE et des IgG1 spécifiques anti-arachide ainsi que des réponses anaphylactiques suites à un challenge (par voie i.p) à l'arachide.

La définition de réaction croisée est basée sur la reconnaissance immunologique : un seul anticorps réagit avec deux molécules différentes possédant chacune au moins un épitope apparenté alors que l'allergie croisée est liée à une réaction allergique obtenue suite un challenge par un allergène Y chez un individu déjà sensibilisé à un premier allergène X mais n'ayant jamais rencontré l'allergène Y. La réaction croisée reflète une relation phylogénique entre les espèces, cela implique un grand degré d'homologie dans les structures protéiques [115]. I*n vitro,* les réactions croisées entre les légumineuses sont fréquentes [35]. Ainsi, Aalberse [115] a observé une réaction croisée *in vitro* entre l'arachide et différentes légumineuses telle que le soja. Quelques cas d'allergie au lupin, légumineuse consommée soit sous forme de graine soit sous forme de farine, ont été publiés [95, 97]. Pour notre part, *in vitro* nous avons obtenu une réaction croisée arachide-lupin pour les souches C3H, CBA et BALB/c qui ont développé des IgE anti-arachide (après sensibilisation intra-péritonéale avec l'extrait d'arachide) qui reconnaissent la farine de lupin. En outre, ces réponses IgE anti-arachide qui croisent avec le lupin blanc sont associées à un rapport IgG1/IgG2a de type Th2. Pour une même dilution des sérums lors des dosages d'anticorps, les taux des IgE anti-arachide qui croisent avec le lupin sont inférieurs aux taux des IgE spécifiques anti-arachide. Nous avons aussi remarqué que les IgE spécifiques anti-arachide qui croisent le plus avec le lupin proviennent des souches qui présentent les meilleurs signes cliniques après challenge avec l'arachide (C3H, CBA). *In vivo*, nous n'avons observé aucune manifestation clinique lors des tests de provocations avec la farine de lupin chez les souris immunisées avec l'extrait d'arachide. Ceci pourrait être du à la formation de complexes immuns qui seraient inefficaces pour déclencher la réponse allergique. *In vitro*, nous avons remarqué une affinité plus faible pour la farine de lupin que pour l'extrait d'arachide (dilutions différentes pour un même signal 4.10^{-2} lupin, 1.10^{-5} arachide). Cette différence d'affinité pour les antigènes peut expliquer l'absence de signes cliniques *in vivo*. Une affinité forte est nécessaire pour déclencher l'activation des signaux membranaires [165].

L'absence de réactions croisées *in vitro* chez la souche SJL pourrait être due à l'absence d'IgE spécifique anti-arachide. Ces souris ne montrant aucun signe d'allergie sont avec les

souris les plus allergiques (C3H) celles qui présentent les taux les plus élevés en isotypes IgGt spécifiques anti-lupin.

En conclusion, nous avons démontré que les réactions croisées *in vitro* arachide-lupin obtenues à partir de sérums de souris sensibilisées avec l'extrait d'arachide ne correspondent pas à une allergie croisée *in vivo* puisqu'il n'y a aucune manifestation clinique quand les souris sont soumises à un challenge (par voie i.p) avec la farine de lupin. Il est intéressant de remarquer que dans les conditions d'immunisation choisies, la souche C3H constitue le meilleur modèle pour le système que nous voulons étudier.

Avantages et limites du modèle utilisé

La validation de notre modèle animal repose sur les manifestations cliniques observées après un challenge allergénique, l'anaphylaxie ne se limitant pas uniquement au décès par choc anaphylactique [166]. Nous avons soigneusement étudié les changements du comportement des animaux après les tests de provocation. Nous avons choisi cette façon de procéder puisque les signes biologiques ne sont pas toujours associés aux signes cliniques. La sécrétion des immunoglobulines spécifiques (IgE et IgG1) garde malgré tout son importance car elle indique le profil Th1/Th2 de l'animal bien que ne traduisant pas le profil allergique des animaux.

Nous avons choisi la voie intrapéritonéale (en présence d'alun), comme voie de sensibilisation chez la souris, car elle est facile d'utilisation et permet d'introduire l'antigène directement au niveau systémique. Elle est efficace, optimise les réponses immunitaires et entraîne une production importante des IgE spécifiques [150].

Pour l'étude des réactions croisées arachide-lupin, nous avons repris le même modèle de sensibilisation. Chez l'homme, la voie orale est la voie naturelle de sensibilisation à l'arachide. Notre modèle n'utilise pas la voie naturelle de sensibilisation. De plus, nous utilisons un adjuvant, alors que la voie naturelle n'en utilise pas ou utilise un adjuvant non identifié. Ces différences peuvent être suffisantes pour induire des modulations dans la réponse anaphylactique. Il est tentant de faire le parallèle avec les variations dans les réponses immunes protectrices consécutives à une infection ou à une vaccination. Dans ce dernier cas, même si le vaccin a montré son efficacité, des différences plus ou moins importantes apparaissent entre la réponse vaccinale et la réponse naturelle (distribution des épitopes reconnus, répartition des isotypes des anticorps spécifiques). Ces modulations

observées peuvent cependant être considérées comme secondaires vis à vis du résultat final: la protection. Dans notre modèle les souris sont réellement allergiques, nous pouvons donc considérer que même si nous ne sommes pas dans des conditions naturelles d'acquisition de l'allergie, nous en sommes proches.

Les résultats que nous avons obtenus dans l'étude d'allergie croisée/réaction croisée arachide-lupin doivent être confortés en utilisant un modèle de souris sensibilisées par voie orale naturelle en l'absence d'adjuvant connu. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas de souris naturellement allergiques à l'arachide.

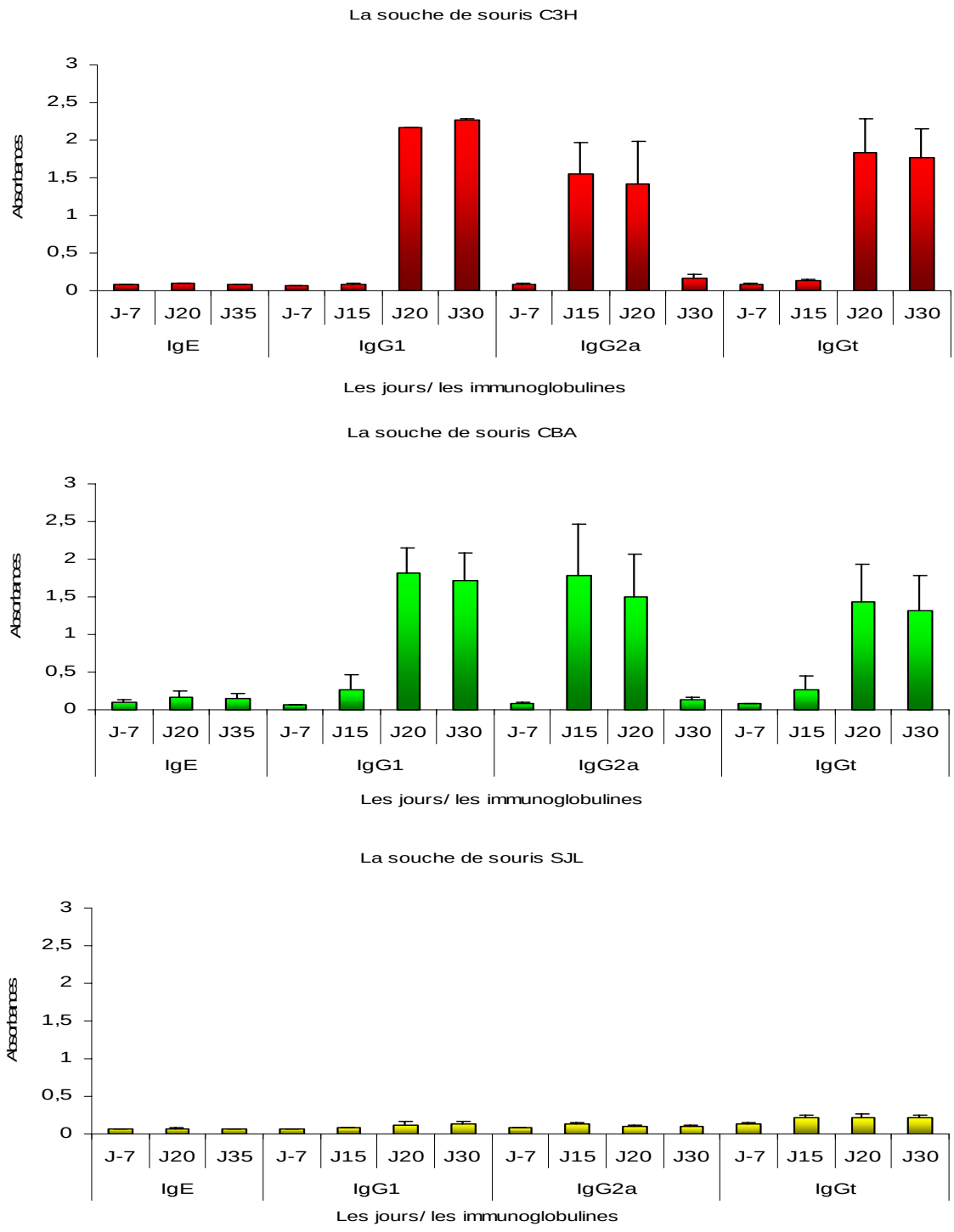

Figure 13: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par i.p avec l'extrait d'arachide en absence d'alun

4-3 Effets, sur la réponse immunitaire, de la voie d'administration, de la souche de souris et de la forme sous laquelle l'antigène est administré

4-3-1 Introduction

Comme la sensibilisation est l'étape cruciale du développement d'une allergie et pour mieux comprendre les mécanismes qui régissent cette phase, nous avons fait varier dans le modèle arachide un certain nombre de facteurs dont la voie d'administration (i.p, i.g, vo) et la forme d'administration de l'antigène (extrait, graine), la présence et l'absence d'adjuvant. En tenant compte des résultats du précédent protocole, trois souches de souris ont été choisies : les souches C3H (H-2^k) et CBA (H-2^k) qui produisent des IgE et présentent des manifestations cliniques et la souche SJL (H-2^s) qui ne produit pas d'IgE et qui ne présente pas de manifestation clinique.

4-3-2 Sensibilisation des souris par voie i.p

En absence d'alun

Réponses biologiques et cliniques (tableau 18)

Notre précédent modèle ayant été obtenu par immunisation intrapéritonéale avec l'extrait d'arachide et en présence d'alun (production d'IgE et d'IgG1 spécifiques et apparition des signes cliniques après tests de provocation, figure 11, tableau 15) nous avons recherché s'il était possible de sensibiliser les souris en absence d'adjuvant. Pour cela, les souris ont reçu trois injections intrapéritonéales d'extrait d'arachide à raison de 10 µg par souris en absence d'alun. En absence d'alun, les trois souches de souris ne produisent pas d'IgE spécifique anti-arachide. Les souris C3H et CBA produisent des taux d'IgG1, IgG2a et IgGt spécifiques significativement très élevés avec un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 1. Par contre, la souche SJL ne produit aucune immunoglobuline (figure, 13). Les souris ayant reçu l'arachide (i.p) en absence d'alun et n'ayant pas développé d'IgE spécifiques ont également été soumises à un test de provocation. 100% des souris C3H et CBA ont montré des signes cliniques (respectivement stade 2 et 3). Ces signes cliniques sont très accentués chez la souche CBA (stade 3). Aucune souris de la souche SJL n'a montré de manifestation clinique (tableau, 18).

Voie d'immunisation	souches	IgG1	IgGT	IgG2a	IgE	IgG1/IgG2a	Stades cliniques	Pourcentage De décès
Extrait arachide i.p + alun	C3H	++	+++	+++	+++	1,4	5	100 %
	CBA	+++++	+++++	++	+++++	2,9	5	80 %
	SJL	+++++	++	+++	-	2,3	-	0
Extrait arachide i.p	C3H	+++++	+++++	+++++	-	1,46	2	0
	CBA	+++++	+++++	+++++	-	1,04	3	0
	SJL	-	-	-	-	-	-	0
Extrait arachide GG	CBA	+++++	++++	++++	+	1,55	-	0
	SJL	+++	++++	+++	-	1,06	-	0
Arachide GG + toxine cholérique	C3H	+++++	+++++	+++++	+	1,25	3	0
	CBA	++++	++++	+++++	++	6,25	2	0
	SJL	++++	+++++	+++	-	1,67	-	0
Extrait arachide GG + Maalox	CBA	+++++	+++++	++	-	6,5	1	0
	SJL	+	+	++	-	1,18	-	0
Extrait arachide v.o	C3H	++	+	++	-	0,56	-	0
	CBA	-	-	+	-	-	-	0
	SJL	-	-	-	-	-	-	0
Extrait arachide v.o + alun	C3H	+	-	-	-	-	-	0
	CBA	-	-	-	-	-	-	0
	SJL	++	++	-	-	-	-	0
Arachide entier v.o	C3H	-	-	-	-	-	-	0
	CBA	-	-	-	-	-	-	0
	SJL	-	-	-	-	-	-	0
Arachide entier v.o + toxine cholérique	C3H	++	+	+	-	1,33	-	0
	CBA	+	++	+	-	1,06	-	0
	SJL	+	++	+	-	1,24	-	0

Tableau 18: Le rapport densité optique / bruit de fond à J_{-7} : <2 = - ; 2-3 = + ; 3-5 = ++ ; 5-7 = +++ ; 7-15 = ++++ ; >15 = +++++

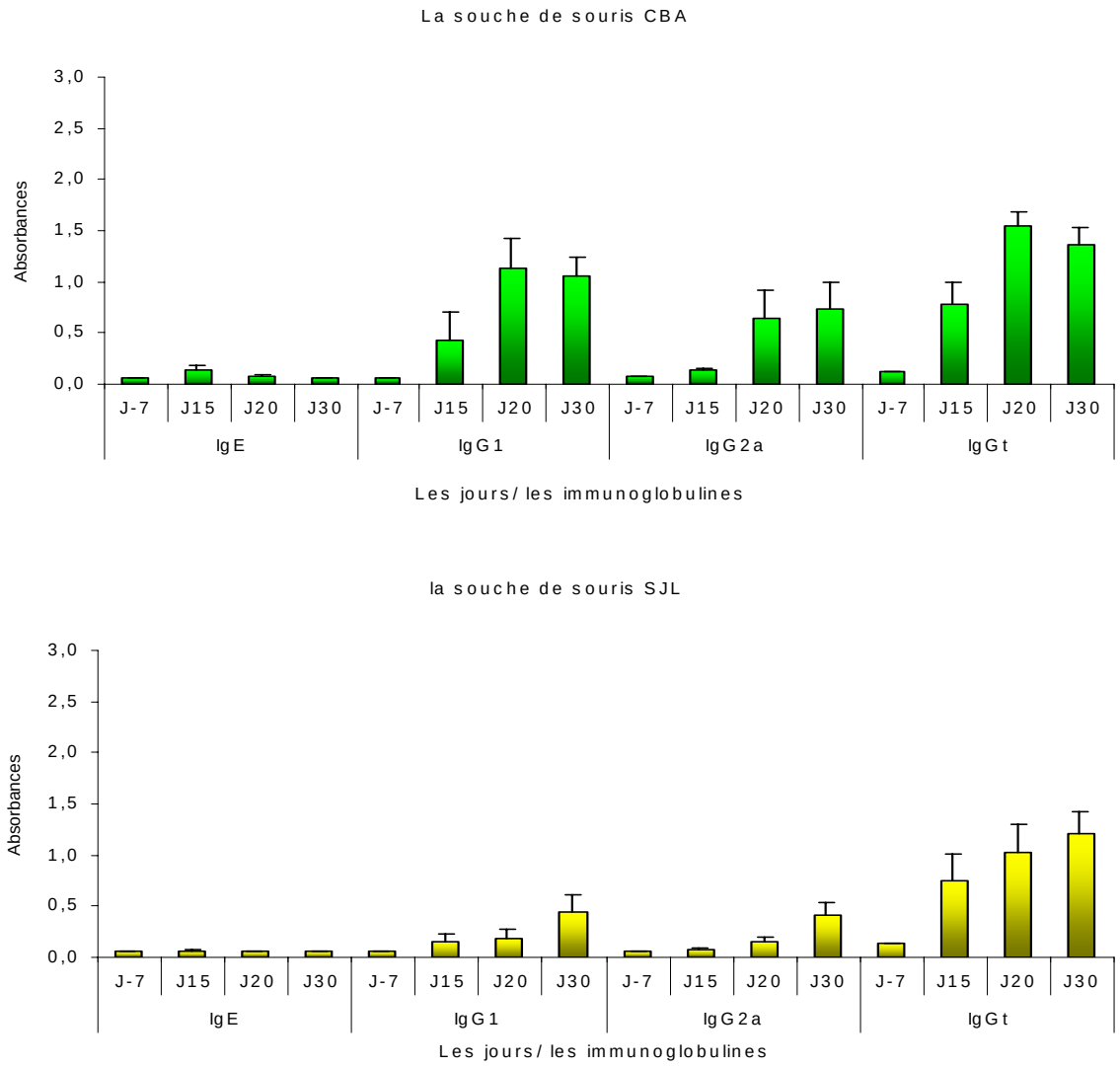

Figure 14: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide sans adjuvant

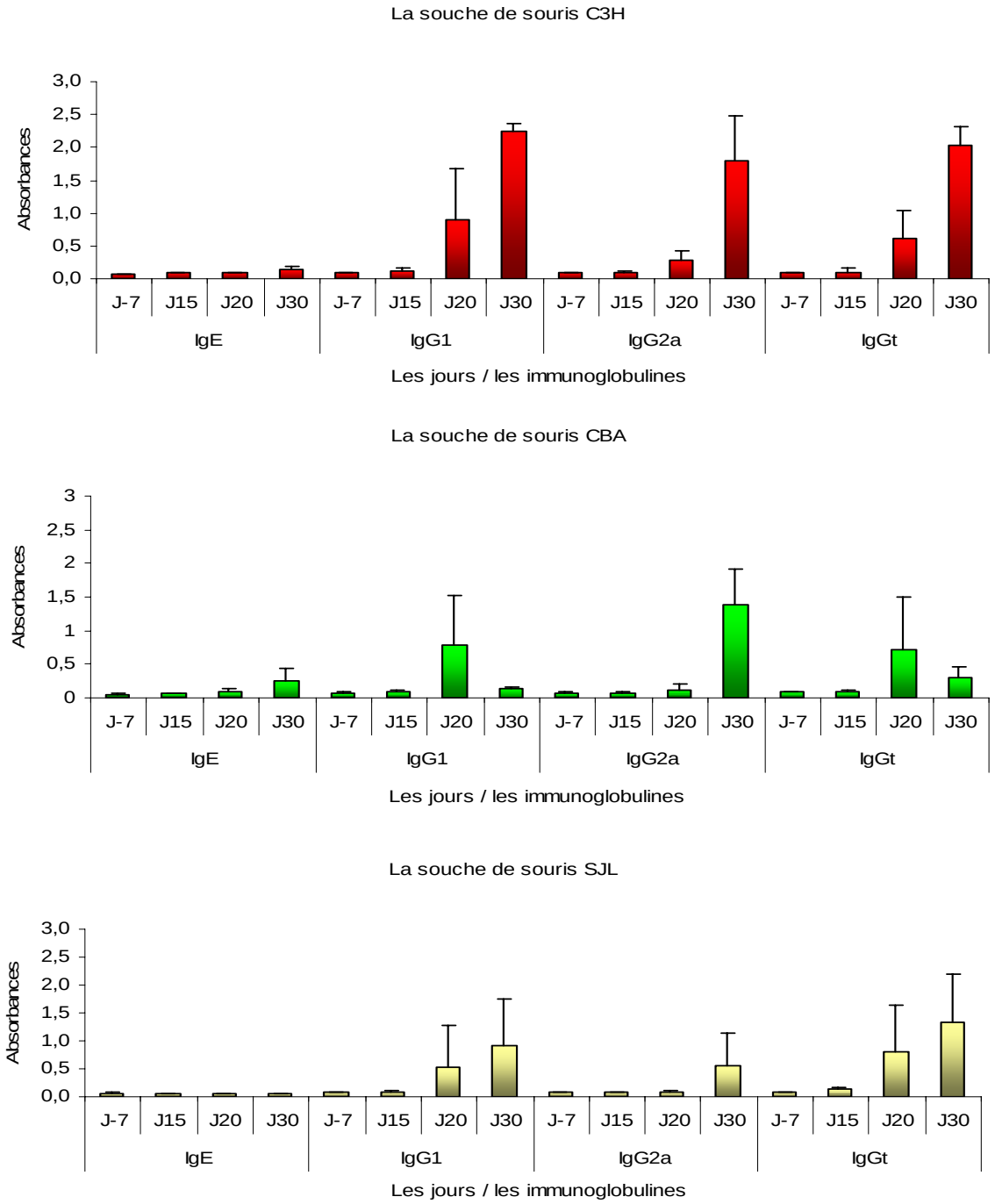

Figure 15: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide associé à la toxine cholérique

4-3-3 Sensibilisation des souris par intubation gastrique

Au cours de cette expérience, nous avons appliqué le protocole utilisé par Li (2000); l'extrait d'arachide est administré par gavage gastrique avec ou sans adjuvant.

A- Réponses biologiques et cliniques après gavage gastrique en absence d'adjuvant (tableau 18)

En absence d'adjuvant, pour la souche CBA, nous observons la présence de faibles titres d'IgE spécifiques anti-arachide. De plus, les titres en IgG1, IgGt et IgG2a spécifiques anti-arachide sont très élevés. En revanche, bien que la souche SJL produise des quantités importantes d'IgG1, d'IgG2a et d'IgGt spécifiques anti-arachide, elle ne produit pas d'IgE (figure 14). Le rapport IgG1/IgG2a est supérieur à 1 pour les deux souches de souris. Trois semaines après la première immunisation, les souris ont subi un test de provocation à l'arachide (10 mg/souris). Aucune manifestation clinique n'est observée pour les deux souches de souris.

B- Réponses biologiques et cliniques après gavage gastrique en présence d'adjuvant (tableau 18)

a- En présence de toxine cholérique

En présence de toxine cholérique, les titres d'IgE spécifiques anti-arachide sont augmentés pour les C3H et CBA à J_{30}. Ces titres sont plus importants pour la souche CBA. Aucune production d'IgE n'a été détectée pour les souris SJL. De plus, les titres en IgG1, IgG2a et IgGt sont augmentés pour les trois souches de souris (figure 15). Le rapport IgG1/IgG2a est supérieur à 1 pour les deux souches de souris (C3H et SJL). Par ailleurs, le groupe de souris témoin, recevant uniquement de la toxine cholérique, ne produit pas d'immunoglobuline. La souche CBA montre des signes cliniques (stade 2) caractéristiques d'une allergie. La souche C3H exhibe des signes cliniques moins importants (stade 1) que ceux observés par la souche CBA. Aucun décès à la suite de ce challenge n'a été observé. La souche SJL ne montre aucun signe clinique. Un deuxième test de provocation a été effectué quinze jours après le premier. Les signes cliniques sont apparus, plus intenses chez la souche de souris C3H (stade 3). Aucune manifestation clinique n'est observée chez les CBA et les SJL.

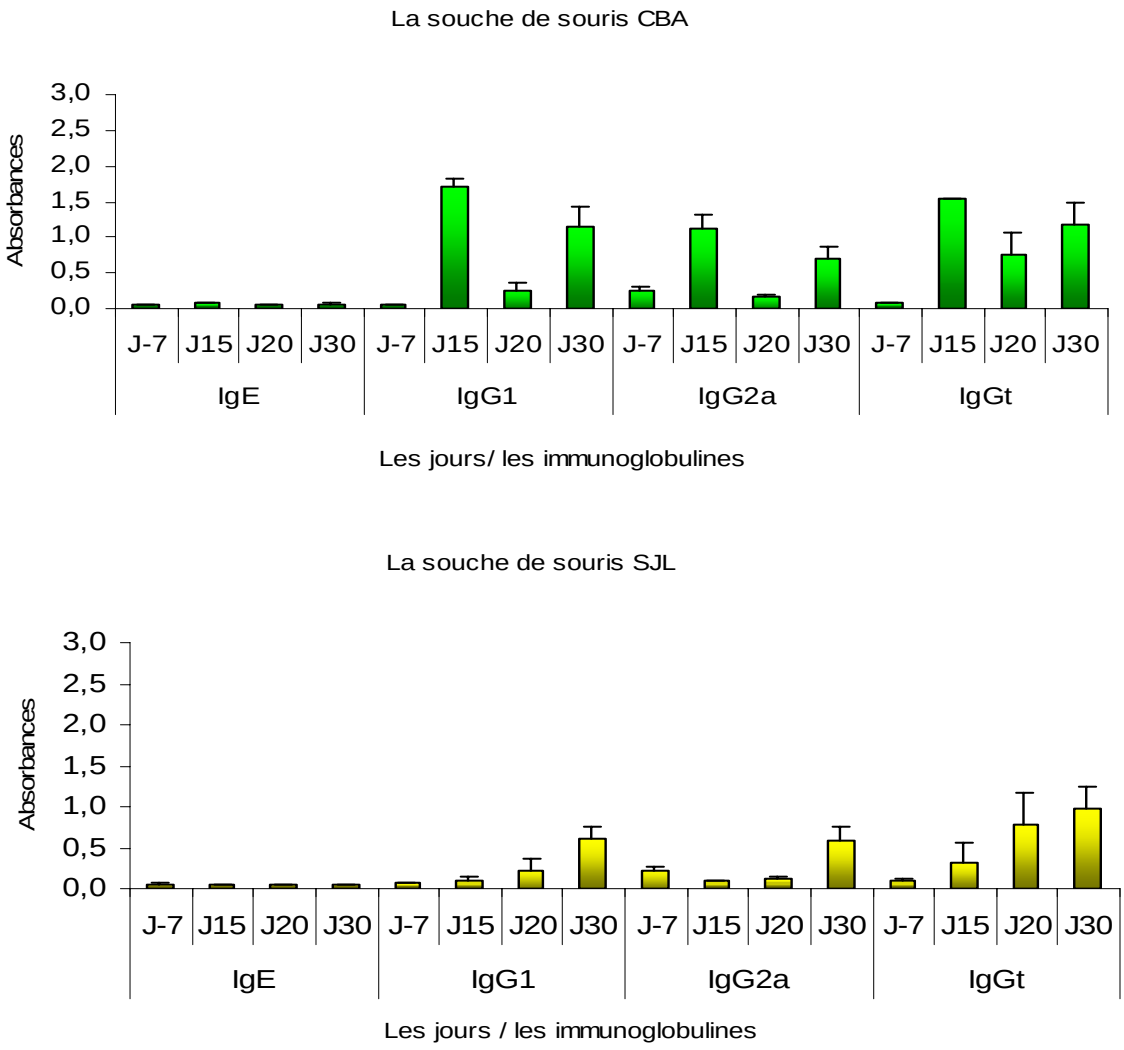

Figure 16: Les absorbances des immunoglobulines sériques spécifiques (IgE, IgG1, IgG2a et IgGt) anti-arachide chez les souris des trois souches C3H, CBA et SJL immunisées par gavage gastrique avec l'extrait d'arachide associé en présence de maalox

b- En présence de Maalox

Deux souches de souris ont été utilisées CBA et SJL. On n'observe pas d'IgE spécifique anti-arachide pour les deux souches. En revanche, les titres d'IgG1 et d'IgGt spécifiques sont élevés pour la souche CBA alors que ceux d'IgG2a spécifiques sont moins importants. La souche SJL quant à elle, montre des niveaux faibles en IgG1, IgGt et IgG2a spécifiques (figure 16). Le rapport IgG1/IgG2a pour les deux souches de souris est supérieur à 1. Les signes cliniques apparaissent rapidement chez la souche CBA (stade 2). La souche SJL, ne répond pas aux tests de provocation à l'arachide.

4-3-4 Sensibilisation des souris par voie buccale.

Les souris ont ingéré l'arachide sous deux formes : extrait et cacahuètes

4-3-4-1 Consommation d'extrait d'arachide en absence et en présence d'alun (ip)

Réponses biologiques et cliniques après consommation d'extrait d'arachide (tableau 18)

a- En absence d'alun

Les résultats obtenus montrent que les taux d'IgE anti-arachide pour les trois souches de souris sont de l'ordre du bruit de fond. Les souris C3H produisent des titres très faibles en IgG1, IgG2a et IgGt spécifiques anti-arachide. Les souris CBA produisent des IgG2a spécifiques en très faible quantité. Enfin, la souche SJL ne produit aucune immunoglobuline spécifique. Les rapports IgG1/IgG2a sont inférieurs à 1 pour la souche C3H. De plus nous avons noté une absence de signes cliniques après les tests de provocation à l'arachide par voie intrapéritonéale chez les trois souches de souris.

b- En présence d'alun

L'injection d'alun en i.p chez des souris qui consomment de l'extrait d'arachide mélangé avec la nourriture, n'entraîne pas de sécrétion d'IgE spécifique. En revanche, on observe des titres très faibles d'IgG1 spécifique pour les souches C3H et SJL. On n'observe aucune immunoglobuline pour la souche CBA. De plus, les tests de provocation chez ces souris n'induisent pas de signe clinique.

4-3-4-2 Consommation d'arachide sous forme de graine entière.

Réponses biologiques et cliniques après consommation de graine d'arachide

a- En absence de toxine cholérique

Dans cette série, la consommation des graines d'arachide chez les trois souches de souris (C3H, CBA et SJL) ne provoque pas la production d'immunoglobulines spécifiques. Aucun signe clinique n'a été observé après les tests de provocation à l'arachide.

b- En présence de la toxine

Les souris C3H, CBA et SJL ont consommé l'arachide sous forme de graine. La toxine cholérique leur a été administrée par gavage gastrique (10 mg/souris). Aucun titre d'IgE spécifique anti-arachide n'a été détecté. En revanche, les trois souches de souris ont présenté des taux significatifs d'IgG1, d'IgG2a et d'IgGt spécifiques anti-arachide et le rapport IgG1/IgG2a est supérieur à 1 chez les trois souches de souris. Les animaux n'ont montré aucun signe clinique suite aux challenges à l'extrait d'arachide par gavage gastrique.

4-3-5 Discussion

Nous avons identifié deux souches de souris sensibles à l'extrait d'arachide. Elles possèdent le fond génétique nécessaire mais non suffisant pour développer une réponse allergique. Nous avons expérimenté plusieurs approches et voies de sensibilisation pour identifier les facteurs environnementaux nécessaires à la manifestation de la réponse allergique.

Lors de la sensibilisation par voie i.p en présence d'alun, nous avons observé chez les souris C3H et CBA des réponses immunologiques de type Th2 avec des taux importants d'IgE, d'IgG1 et d'IgGt spécifiques et un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 1, mais également des signes cliniques entraînant le décès après un challenge allergénique. Ces deux souches portent l'allèle *k* dans la région A du complexe majeur d'histocompatibilité H-2. La souche SJL quant à elle, ne produit pas d'IgE spécifique et ne manifeste pas de symptôme clinique. Par contre elle sécrète des IgG1, IgG2a et IgGt spécifiques et présente un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 1 indicatif de réponse de type Th2. Comme on l'a dit antérieurement, le CMH, chez la souris, influence la balance Th1/Th2. Au cours de l'immunisation sans alun, les souris C3H et CBA produisent des IgG1, IgG2a et IgGt spécifiques anti-arachide dont les absorbances sont supérieures à celles obtenues en présence d'alun. En revanche, l'adjuvant est nécessaire pour l'obtention d'IgE détectables. L'induction d'une réponse allergique est dépendante de la dose d'antigène dans un environnement altéré induit par l'adjuvant. Si l'alun augmente le taux d'IgE, la réponse spécifique reste dépendante de l'antigène [167]. L'alun modifie également la réponse IgG

spécifique. Sans alun la souche SJL ne produit pas d'IgG spécifiques détectables. Sans alun la souche CBA produit plus d'IgG2a, la souche C3H produit plus d'IgGt, d'IgG1 et d'IgG2a spécifiques (tableau 18).

Nous avons aussi démontré qu'une sensibilisation intrapéritonéale en absence d'alun induit des réactions anaphylactiques après un challenge allergénique malgré l'absence en IgE spécifique. Ces signes cliniques sont moins prononcés que ceux observés chez les souris immunisées avec l'extrait d'arachide en présence d'alun. Chez la souris, des réactions anaphylactiques peuvent survenir en l'absence d'IgE, grâce à la présence de récepteurs fonctionnels, autres que les FcεRI, impliqués dans les réactions d'hypersensibilité immédiate. Il s'agit de récepteurs à IgG :FcγRI, FcγRII [163, 168] et plus particulièrement FcγRIII [169] présents sur les mastocytes.

Les expériences portant sur des souris déficientes en IgE ou en IgG1 ont montré que ces deux isotypes peuvent induire de façon indépendante une réaction anaphylactique fatale après contact avec certains antigènes parasitaires [170]. Généralement, le choc anaphylactique est étroitement lié aux IgE [171] mais il peut être aussi lié seulement aux IgG1 spécifiques [158]. Dans nos conditions expérimentales, la production d'IgE est accompagnée d'une production d'IgG1, l'inverse n'est pas vrai. Des investigations plus approfondies seraient nécessaires pour préciser la fonction exacte de chaque isotype dans l'apparition des symptômes cliniques après un challenge allergénique.

Les administrations par voie i.p en présence d'alun ont permis dès 1970 de différencier des souches de souris « fortes » et « faibles » répondeuses. Une étude portant sur de nombreuses souches de souris a montré que l'administration de faibles doses d'immunogène (conjugué protéine-haptène à 0,1 ou 1 μg, avec 1 mg d'alun) permet l'induction d'une réponse IgE et IgG1 spécifiques chez certaines souches de souris, définies comme « fortes répondeuses ». Ce caractère est lié aux haplotypes $H\text{-}2^k$ et $H\text{-}2^a$ [172]. L'alun est donc un adjuvant très utilisé, permettant l'induction d'une réponse IgE spécifique élevée et persistante.

Au cours de la deuxième étape de ce travail, nous avons étudié l'effet du gavage gastrique en présence et en absence de toxine cholérique (TC). La toxine est produite par la bactérie Vibrio cholerae, qui modifie les échanges d'eau et d'électrolytes dans l'intestin en empêchant la pénétration du sodium à l'intérieur des cellules, provoquant ainsi diarrhée, vomissements et déshydratation, symptômes caractéristiques du choléra. Durant notre protocole, les

animaux ont été mis sous observation après l'administration de TC et aucun des symptômes cités précédemment n'a été rapporté. La toxine cholérique de Vibrio cholerae est un puissant adjuvant utilisé chez l'animal. Snider [173] a démontré que l'administration orale de cette toxine avec différents antigènes (ovalbumine, lysosyme extrait de l'œuf de poule), suivi 3 et 6 semaines plus tard d'un challenge par injection i.p de l'antigène seul, conduit à un choc anaphylactique chez 4 souches de souris sur les 5 testées. Les taux d'histamine sérique sont très élevés, de même que les taux d'IgE, IgG1, IgG2a et IgA spécifiques, avec un rapport IgG1/IgG2a supérieur à 1, indicatif d'une forte réponse Th2.

Avec l'extrait d'arachide en présence de toxine cholérique, nos résultats s'accordent avec ceux publiés par Li [135] qui a utilisé un protocole expérimental similaire au notre. En effet, au cours de cette étude nous avons réussi à obtenir une réponse allergique chez les C3H et CBA. Ces deux souches montrent des titres significatifs en IgE, IgG1, IgGt anti-arachide et expriment des signes cliniques suite à un challenge allergénique par voie orale avec l'extrait d'arachide. Les signes cliniques sont plus importants chez la souche CBA que la souche C3H. Chez les CBA, on constate que la toxine induit une production plus importante d'IgE anti-arachide. Par contre, nous n'avons noté aucun cas de décès. La toxine cholérique n'a aucun effet sur la production d'IgE spécifiques sur la souche SJL. Comme nous l'avons remarqué antérieurement, le CMH joue un rôle très important dans la réponse immunitaire: les deux souches C3H et CBA, qui ont les même isotype *k* sont également allergiques à l'arachide par gavage gastrique en présence de toxine cholérique.

Les infections virales et parasitaires sont connues pour induire l'augmentation d'IgE spécifiques chez l'enfant et chez l'adulte. Elles entraînent aussi l'altération de l'intégrité de la flore intestinale. Ceci explique que chez les souris, la présence de toxine cholérique, administrée par gavage avec l'arachide, favorise l'apparition des IgE spécifiques anti-arachide. Les mécanismes de l'effet adjuvant de la toxine cholérique ne sont pas connus. Il semble que des cellules T produisant de l'IL-4 soient présentes au niveau des tissus lymphoïdes intestinaux lors l'administration orale de la toxine pouvant conduire à la production d'IgE spécifiques [173].

Nous avons remarqué que les souches de souris bonnes répondeuses en IgE spécifiques et présentant des signes cliniques dans le protocole i.p avec alun le sont aussi dans le protocole gavage gastrique avec la toxine cholérique ce qui confirme la validité de notre modèle. Par

contre, l'intensité des signes est moins prononcée chez les souris sensibilisées par gavage gastrique.

Dans notre recherche pour évaluer le rôle des facteurs de risque dans l'induction de réactions allergiques sévères aux aliments, nous avons étudié l'effet du maalox. Le maalox dont la composition est voisine de celle de l'alun est utilisé ici pour ses propriétés anti-acide. Approximativement 10% des adultes ont recours à des médications anti-acides pour traiter les troubles dyspeptiques. Toutefois, ces médicaments limitent la digestion pepsique. Chez ces patients, les protéines qui sont moins digérées (moins dégradées) peuvent agir comme antigènes/allergènes alimentaires [151]. En effet, en dehors de leurs effets intrinsèques, de nombreux médicaments ont été incriminés comme facteurs de risque des anaphylaxies [174, 175]. Nous connaissons le rôle de l'aspirine et des AINS comme co-facteur [176, 177]. Dans notre étude, il s'agit d'envisager l'effet d'un anti-acide sur la genèse de l'allergie alimentaire sur un modèle souris. Des souris CBA et SJL ont reçu par voie digestive (GG) des protéines avec ou sans maalox. Nous avons démontré qu'en présence de maalox, la souche CBA, ne produit pas d'IgE spécifiques mesurables, par contre secrète un taux très important en IgG1 (IgG1/IgG2a supérieur à 1, indicatif d'une réponse de type Th2) et manifeste des signes cliniques (stade 1) suite aux tests de provocation avec l'extrait d'arachide par voie orale. Comme nous avons expliqué précédemment, les IgG1 peuvent être aussi responsables de signes cliniques en l'absence des IgE spécifiques.

L'équipe d'Untersmayr [151, 155] a étudié l'influence des apports d'antiacide sur l'allergénicité des protéines alimentaires, en utilisant le caviar d'esturgeon et une parvalbumine. Cette équipe a démontré *in vitro* l'altération de la digestion protéique en présence des anti-acides, *in-vivo* la sécrétion d'IgE spécifiques et l'apparition de signes cliniques chez les souris recevant un anti-acide associé à l'antigène, alors que l'administration de ces protéines seules n'a pas d'effet. Dans notre cas, nos résultats sont légèrement différents. L'association de l'antiacide avec l'extrait d'arachide provoque bien l'allergie chez notre modèle de souris (CBA) puisque ce denier exhibe des signes cliniques à la suite de tests de provocation par voie orale avec l'extrait d'arachide malgré l'absence d'IgE détectable. La sensibilisation avec l'extrait d'arachide administré par gavage gastrique sans adjuvant, entraîne une très faible production d'IgE spécifique sans manifestation clinique suite à un challenge avec l'extrait d'arachide par voie orale.

L'immunisation des souris par voie intra-péritonéale et par intubation gastrique entraîne la production d'anticorps spécifiques d'isotypes IgE et IgG1 capables de déclencher une réaction allergique chez certaines souches de souris. Pour compléter notre travail, nous avons essayé de nous rapprocher du modèle humain, et nous avons examiné l'effet de la consommation naturelle d'arachide sur les souris et principalement sur les souches qui ont répondu positivement par des signes cliniques après sensibilisation intra-péritonéale et gavage gastrique.

L'ingestion de l'arachide a été explorée par voie naturelle chez les mêmes souches de souris (C3H, CBA et SJL). L'arachide dans cette expérience a été utilisée sous deux formes; extrait d'arachide (une dose avoisinante 2,5 mg/souris/24h/une fois par semaine/3 mois) et de graines d'arachide (3 g/souris/24 h/une fois par semaine/2 mois). L'extrait d'arachide a été mélangé à un aliment standard avec ou sans alun (administré par voie ip) tandis que les graines d'arachide sont données seules en présence ou en absence de toxine cholérique (administrée par i.g). En présence d'alun, seules des réponses biologiques ont été observées chez les souches SJL (IgG1 et IgGt) et C3H (IgG1). En absence d'alun, les résultats sont différents, nous avons noté des titres significatifs en IgG1, IgG2a et IgGt chez la souche C3H et en IgG2a chez la souche CBA. En conclusion par voie naturelle, aucune IgE spécifique n'est mesurable et aucune manifestation clinique n'a été constatée. Cependant, Ito et son équipe [3] ont obtenu des IgE spécifiques avec une souche (DBA/2) et un antigène (caséine) différents. Ils ont démontré que la souche DBA/2 recevant de la caséine à forte dose par voie orale naturelle sous forme d'un régime contenant 25% de caséine (400 à 500 mg/ jour) et mis à disposition des souris pendant 63 jours sans adjuvant, produit des réponses IgE spécifiques. Ces auteurs n'ont pas obtenu les mêmes résultats avec les souris BALB/c et B10A qui ont subit le même protocole, même si la souche BALB/c porte le même haplotype (H-2^d) que la souche DBA/2. Cette même souche, DBA/2, répond aussi par des signes biologiques et des signes cliniques à une sensibilisation intrapéritonéale à la caséine comme nous l'avons montré lors de l'étude de l'allergénicité des résidus de produits de collage utilisés au cours de la vinification. Toutefois, lorsque Ito utilise l'ovalbumine, il n'a pas obtenu d'IgE spécifique. Ces résultats indiquent que la souche DBA/2 est sensible à la caséine par voie orale naturelle et sans adjuvant mais pas à l'ovalbumine. Cette divergence entre nos résultats et ceux d'Ito peut être due à la nature de l'antigène utilisé (arachide versus caséine) et/ou à la dose d'immunogène, à la fréquence d'administration et à la durée du protocole qui sont beaucoup plus importantes dans l'étude d'Ito.

L'ingestion de graines d'arachide en absence de toxine cholérique ne produit aucune immunoglobuline spécifique tandis qu'en présence de TC toutes les immunoglobulines sont sécrétées hormis les IgE spécifiques. Aucun signe clinique n'a été noté lors de ces deux protocoles. On peut déduire que l'administration de graines d'arachide seules entraîne, chez un modèle sensibilisable, une tolérance orale vis à vis des cacahuètes. Plusieurs facteurs interviennent dans l'induction de la tolérance orale. Il a été démontré qu'un régime à faible teneur en protéines favorise l'induction de la tolérance orale à un antigène alimentaire par une diminution des cytokines de type Th2 [178]. La nature de l'antigène (natif ou hydrolysé) joue aussi un rôle important dans le développement de la tolérance [179, 180]. En effet, plus les protéines sont hydrolysées, moins elles induisent la tolérance [179, 181]. D'autres facteurs semblent jouer un rôle important dans l'induction et le maintien de la tolérance orale: la fréquence d'administration [182] et le patrimoine génétique [183]. En revanche, en présence de toxine cholérique, la réponse immunogène est favorisée, la tolérance orale est cassée [184, 185]. On retrouve encore une fois l'effet de la toxine cholérique dans l'induction d'une réponse de type Th2 si on considère le rapport IgG1/IgG2a.

On peut conclure que la voie orale naturelle utilisée, dans notre travail, sur un modèle souris sensibilisable (C3H et CBA), en présence et en absence d'adjuvant, ne provoque pas d'allergie.

Malheureusement, il est difficile de savoir si une souche de souris est allergique ou pas, en se basant uniquement sur des signes biologiques: titres en immunoglobulines. En effet, comme on a pu le voir dans ce travail, ni les IgE ni les IgG1 spécifiques ne sont des facteurs suffisant pour confirmer un état allergique et les tests de provocations restent nécessaires pour obtenir un tableau clinique caractéristique de l'allergie.

Comparaison des différentes voies d'administration :

Les différences de réponses en immunoglobulines spécifiques par rapport aux différentes voies d'administration sont connues: forte réponse par voie systémique et par voie orale avec adjuvant et pas de réponse ou réponse faible par voie orale sans adjuvant muqueux.

Si nous étudions les réponses immunes liées à l'allergie, par immunisation i.p en absence d'alun les deux souches bonnes répondeuses C3H et CBA (i.p + alun) expriment des signes cliniques en absence d'IgE. Comme on l'a dit précédemment, les IgG1 spécifiques pourraient induire par elles-mêmes des signes cliniques chez certaines souches de souris en

absence d'IgE spécifiques [135, 158, 163, 186]. Dans notre travail, bien qu'ayant un taux très élevé en IgG1 spécifiques, la souche SJL, ne montre pas de signe clinique. Ainsi pour induire l'allergie par voie i.p, l'administration de l'antigène seul, dans notre cas l'arachide, serait suffisante. La présence d'alun est importante si on souhaite produire des IgE spécifiques détectables.

Par gavage gastrique, le maalox ou la toxine cholérique, sont indispensables pour l'expression des signes cliniques chez les CBA (test de provocation par voie gastrique). En effet, en absence de l'un ou l'autre adjuvant, bien que les titres d'IgG1 restent significativement élevés et les IgE présentes, on note l'absence de manifestation clinique après le test de provocation à l'arachide par intubation gastrique.

En comparant les deux voies d'administration (i.p et ig), nous avons constaté que les titres d'anticorps, principalement les IgE, et l'intensité des signes cliniques chez les souris CBA et C3H immunisées par voie intra-péritonéale en présence d'alun sont nettement plus élevés que celles obtenues chez les mêmes souches sensibilisées par intubation gastrique en présence de toxine cholérique ou en présence de maalox. Pour déclencher, par intubation gastrique, une réponse clinique allergique, chez des souches de souris sensibilisables, l'introduction d'un cofacteur en plus de l'allergène est nécessaire.

Finalement, nous avons comparé les essais de sensibilisation par gavage gastrique et/ou par voie orale naturelle (graines ou extraits d'arachide) en présence et en absence d'adjuvant, pour nous rapprocher de la sensibilisation chez l'homme et pour essayer de déterminer les facteurs (extrinsèques et/ou intrinsèques) nécessaires à la manifestation de la réponse allergique. Nous n'avons pas réussi à obtenir des souris allergiques à l'arachide par voie orale sans adjuvant à partir des mêmes souches allergiques par voie i.p. La voie orale induit plutôt la tolérance orale, des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer quels cofacteurs peuvent casser cette tolérance orale.

5- CONCLUSION

L'allergie alimentaire est un problème sérieux de santé publique dans les pays industrialisés et les facteurs qui influencent son développement sont encore largement inconnus. C'est donc un enjeu et un souci, à la fois pour les industries agroalimentaires et pour les Pouvoirs Publics en charge de la santé des consommateurs, que de disposer de moyens d'évaluer, gérer, et si possible prévenir le risque allergique (allergénique) des aliments.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents entraînant le développement d'une allergie alimentaire chez l'homme, un modèle animal approprié à l'allergie alimentaire se révèlerait très utile. De plus, il permettrait aux industries agroalimentaires, dans un avenir proche, de disposer d'un moyen simple et efficace pour évaluer le potentiel allergénique des additifs et des nouveaux produits alimentaires avant leur mise sur le marché. Cependant, disposer d'un modèle animal pour étudier l'allergénicité et le potentiel allergique des protéines alimentaires est une tache très difficile à réaliser.

Dans ce travail, je présente les résultats d'un protocole de sensibilisation aux protéines alimentaires développé avec succès chez la souris. Ces résultats montrent que la souris peut être sensibilisée par voie intra-péritonéale à différentes protéines alimentaires allergisantes (arachide, albumine, caséine et colle de poisson) entraînant une réponse à IgG1 et à IgE sériques spécifiques, ainsi que des manifestations cliniques pouvant aboutir à un choc anaphylactique suite aux tests de provocation.

L'objectif de cette étude était d'établir un modèle de souris allergique :

- A la colle de poisson flocon, à la caséine, à l'ovalbumine, afin d'étudier l'allergénicité des vins après les différentes étapes du collage.

- A l'arachide afin d'étudier la réaction croisée arachide-lupin.

En qui concerne le modèle animal de sensibilisation, notre but était d'obtenir, chez la souris, une sécrétion d'IgE et d'IgG1 spécifiques (ces isotypes étant caractéristiques d'une sensibilisation) suivie des manifestations cliniques suites aux tests de provocation aux différents antigènes.

Dans l'étude sur le collage des vins, j'ai étudié l'allergénicité des vins collés sur quatre souches de souris (C3H, CBA, DBA /2 et SJL). J'ai montré que la décantation, la filtration, et le vieillissement, sont des étapes cruciales pour l'élimination des produits utilisés pour la

clarification des vins. Ces étapes sont nécessaires pour éviter le danger que peuvent présenter les résidus antigéniques de ces produits pour les consommateurs qui y sont allergiques.

Dans la deuxième partie de mon travail, j'ai étudié la réaction croisée arachide-lupin chez les souris BALB/c, C3H, CBA et SJL et j'ai démontré que la réaction croisée arachide-lupin *in vitro* n'implique pas une allergie croisée arachide-lupin.

Dans la dernière partie de mon travail concernant l'allergie à l'arachide, plusieurs protocoles de sensibilisation ont été optimisés afin d'identifier les facteurs environnementaux essentiels à la manifestation de la réponse allergique et à l'amélioration de notre modèle animal. J'ai étudié plus précisément un protocole de sensibilisation par voie orale naturelle pour me rapprocher des conditions de sensibilisation rencontrées chez l'homme. Cependant, la sensibilisation par l'arachide par voie orale naturelle et sans adjuvant, est très difficile à obtenir chez la souris. La voie orale induit plutôt la tolérance orale. En raison des nombreux facteurs impliqués dont: la souche de souris, l'adjuvant et la dose d'antigène administrée, la voie orale mériterait des études complémentaires.

Pour obtenir un modèle de souris allergiques à l'arachide, le moyen le plus rapide et le plus efficace reste la voie intrapéritonéale en présence d'adjuvant et particulièrement l'alun.

Mes résultats montrent que la souris serait donc un modèle animal approprié pour la recherche dans le domaine de l'allergie alimentaire et pour l'étude du potentiel allergisant des aliments existants, mais aussi des nouvelles protéines alimentaires.

6- PERSPECTIVES

En ce qui concerne les expériences futures,

I- Pour l'allergénicité des vins il faudra

Dans un premier temps, purifier les anticorps de lapins pour les utiliser dans la détection et le dosage des colles sur les échantillons de vins à tester (ELISA)

Comparer les résultats obtenus *in vivo* (allergénicité) et in *vitro* (antigénicité).

Dans un second temps, réaliser des tests cutanés, sur des patients allergiques au lait de vache, au blanc d'œuf et au poisson, avec chacune des trois colles (caséine, albumine avec lysozyme et colle de poisson flocon) et avec différents échantillons de vins commercialisés.

Enfin, l'utilisation de lignés cellulaires humaines serait un moyen rapide pour mettre en évidence la dégranulation en présence d'antigène.

II- Pour la réaction croisée arachide-lupin: il faudra étudier chez les mêmes souches de souris la réaction croisée lupin-arachide et compléter les tests biologiques et cliniques par le test cutané (passive cutaneous hypersensitivity testing : PCA) pour essayer de discriminer entre les IgE et les IgG1 réaginiques.

III- l'étude de la sensibilisation par voie orale sera poursuivie. Chez le modèle souris, il faudra faire varier les doses et la fréquence d'administration des allergènes, et tester le rôle de différents adjuvants autre que l'alun et la toxine cholérique.

7- BIBLIOGRAPHIE

1. Andre, Les sensibilisations les plus fréquentes chez 500 porteurs d'allergies alimentaires. Rev Fr Allergol, 1992. 32: p. 11-15.
2. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, 1989. 7: p. 145-73.
3. Ito, K., et al., Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. European Journal of Immunology, 1997. 27(12): p. 3427-3437.
4. Cavaillon, J.M., et al., CD14/LPS receptor exhibits lectin-like properties. Journal of Endotoxin Research, 1996. 3(6): p. 471-480.
5. Murray, J., How the MHC selects Th1/Th2 immunity. Immunology Today, 1998. 19(4): p. 157-163.
6. Sedlik, C., Th1 and Th2 subsets of T lymphocytes: Characteristics, physiological role and regulation. Bulletin de L Institut Pasteur, 1996. 94(3): p. 173-200.
7. Mosmann, T.R. and S. Sad, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today, 1996. 17(3): p. 138-46.
8. Tunon, d.l.J., Th1/Th2: la fin d'un dogme. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2002. 42: p. 559-564.
9. Revillard, J.P., Immunologie. De Boeck & Larcier, Bruxelles, 1995.
10. Novak, N., S. Kraft, and T. Bieber, IgE receptors. Current Opinion in Immunology, 2001. 13(6): p. 721-726.
11. Hakimi, J., et al., The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding. J Biol Chem, 1990. 265(36): p. 22079-81.
12. Blank, U., C.S. Ra, and J.P. Kinet, Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. J Biol Chem, 1991. 266(4): p. 2639-46.
13. Saini, S.S. and D. MacGlashan, How IgE upregulates the allergic response. Current Opinion in Immunology, 2002. 14(6): p. 694-697.
14. Katoh, N., et al., The high-affinity IgE receptor (FcepsilonRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. J Clin Invest, 2000. 105(2): p. 183-90.
15. Novak, N., T. Bieber, and N. Katoh, Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. J Immunol, 2001. 167(2): p. 797-804.
16. Reljic, R., G. Cosentino, and H.J. Gould, Function of CD23 in the response of human B cells to antigen. Eur J Immunol, 1997. 27(2): p. 572-5.
17. RiffoVasquez, Y., S. Pitchford, and D. Spina, Murine models of inflammation: role of CD23. Allergy, 2000. 55: p. 21-26.
18. Kaiserlian, D., et al., Intestinal epithelial cells express the CD23/Fc epsilon RII molecule: enhanced expression in enteropathies. Immunology, 1993. 80(1): p. 90-5.
19. Yang, P.C., et al., Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (Fc epsilon RII). Journal of Clinical Investigation, 2000. 106(7): p. 879-886.

20. Kung, T.T., et al., Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. 12(4): p. 404-9.
21. Warner, J.A. and C. Kroegel, Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. Eur Respir J, 1994. 7(7): p. 1326-41.
22. Enerback, L., The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils. Allergy, 1997. 52(1): p. 4-10.
23. Molina, C., L'allergie à l'aube du troisième millénaire. John Libbey Eurotext, Paris, 1995.
24. Wardlaw, A.J., Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. Postgrad Med J, 1994. 70(826): p. 536-52.
25. Yssel, H., et al., The role of IgE in asthma. Clin Exp Allergy, 1998. 28(Suppl 5): p. 104-9; discussion 117-8.
26. Teran, L.M. and D.E. Davies, The chemokines: Their potential role in allergic inflammation. Clinical and Experimental Allergy, 1996. 26(9): p. 1005-1019.
27. Rancé, F. and E. Bidat, Allergies alimentaires chez l'enfant. Médecine et Hygiènne, 2000: p. 134-150.
28. Wal, J.M., Allergies alimentaires: mécanismes physiopathologiques, identification des allergènes alimentaires. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2004. 18: p. 15-19.
29. Yocum, M.W., et al., Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study. J Allergy Clin Immunol, 1999. 104(2 Pt 1): p. 452-6.
30. Bock, S.A., A. MunozFurlong, and H.A. Sampson, Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001. 107(1): p. 191-193.
31. Metcalfe, D.D. and H.A. Sampson, Food allergy: Adverse reactions to foods and foods additives. Blackwell Scientific Publications, 1991: p. 623-646.
32. Dutau, G.R., F. Michaud, A. Juchet and Brémont, F, Farines et allergie: les pièges à ne pas méconnaître. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2003. 42(3): p. 289-298.
33. Sampson, H.A., L. Mendelson, and J.P. Rosen, Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. N Engl J Med, 1992. 327(6): p. 380-4.
34. Moneret-Vautrin, D.A. and G. Kanny, [Food-induced anaphylaxis. A new French multicenter survey]. Ann Gastroenterol Hepatol (Paris), 1995. 31(4): p. 256-63.
35. Moneret-Vautrin, D.A.k., G, L'allergie alimentaire à l'arachide: problème de santé publique. Rev Med Interne, 1999. 20: p. 319-321.
36. Young, E., et al., A population study of food intolerance. Lancet, 1994. 343(8906): p. 1127-30.
37. Jansen, J.J., et al., Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. J Allergy Clin Immunol, 1994. 93(2): p. 446-56.
38. Kanny, G., et al., Population study of food allergy in France. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001. 108(1): p. 133-140.
39. Varjonen, E., et al., Prevalence of atopic disorders among adolescents in Turku, Finland. Allergy, 1992. 47(3): p. 243-8.
40. Bjornsson, E., et al., Prevalence of sensitization to food allergens in adult Swedes. Ann Allergy Asthma Immunol, 1996. 77(4): p. 327-32.

41. Iikura, Y., et al., Frequency of immediate-type food allergy in children in Japan. Int Arch Allergy Immunol, 1999. 118(2-4): p. 251-2.
42. Sampson, H.A., Update on food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. 113(5): p. 805-819.
43. Munoz-Furlong, A., Patient's perspective and public policy regarding anaphylaxis. Novartis Found Symp, 2004. 257: p. 265-74; discussion 274-5, 276-85.
44. Rancé, F., et al., Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. Pediatr Allergy Immunol, 1999. 10(1): p. 33-8.
45. MoneretVautrin, D.A., et al., Food allergy to peanuts in France - evaluation of 142 observations. Clinical and Experimental Allergy, 1998. 28(9): p. 1113-1119.
46. Moneret-Vautrin, D.A.k., L, Accidents graves par allergie alimentaire en France: fréquence, caractéristiques cliniques et étiologiques. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2001. 41(8): p. 696-700.
47. Tariq, S.M., et al., Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years. Bmj, 1996. 313(7056): p. 514-7.
48. Sicherer, S.H., et al., Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(4): p. 559-62.
49. Sicherer, S.H., et al., Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial survey. (Vol 103, pg 559, 1999). Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000. 105(3): p. 576.
50. Eggesbo, M., et al., The prevalence of allergy to egg: a population-based study in young children. Allergy, 2001. 56(5): p. 403-11.
51. Hosking, C.S., R.G. Heine, and D.J. Hill, The Melbourne milk allergy study two decades of clinical research. ACI International, 2000. 5: p. 198-205.
52. Halken, S., et al., Effect of an allergy prevention programme on incidence of atopic symptoms in infancy. A prospective study of 159 "high-risk" infants. Allergy, 1992. 47(5): p. 545-53.
53. Sporik, R. and D. Hill, Allergy to peanut, nuts, and sesame seed in Australian children. Bmj, 1996. 313(7070): p. 1477-8.
54. Dutau, G.R., J. Rance, F. Juchet, A. Brement, F., Les nouveaux allergènes alimentaires. La Presse Médicale, 1999. 28(28): p. 1553-1559.
55. Moneret-Vautrin, D.A., R. Hatahet, and G. Kanny, Risks of milk formulas containing peanut oil contaminated with peanut allergens in infants with atopic dermatitis. Pediatr Allergy Immunol, 1994. 5(3): p. 184-8.
56. Martin, J.A., et al., Bronchial asthma induced by chick pea and lentil. Allergy, 1992. 47(2 Pt 2): p. 185-7.
57. Navarro, C., et al., Epidemic asthma in Cartagena, Spain, and its association with soybean sensitivity. Epidemiology, 1993. 4(1): p. 76-9.
58. Onorato, J., et al., Placebo-controlled double-blind food challenge in asthma. J Allergy Clin Immunol, 1986. 78(6): p. 1139-46.
59. Novembre, E., M. de Martino, and A. Vierucci, Foods and respiratory allergy. J Allergy Clin Immunol, 1988. 81(5 Pt 2): p. 1059-65.
60. Novembre, E., et al., Anaphylaxis in children: clinical and allergologic features. Pediatrics, 1998. 101(4): p. E8.

61. Pumphrey, R.S. and S.J. Stanworth, The clinical spectrum of anaphylaxis in north-west England. Clin Exp Allergy, 1996. 26(12): p. 1364-70.
62. Eigenmann, P.A., Future therapeutic options in food allergy. Allergy, 2003. 58(12): p. 1217-1223.
63. Eigenmann, P.A., F.D. Pastore, and S.A. Zamora, An Internet-based survey of anaphylactic reactions to foods. Allergy, 2001. 56(6): p. 540-3.
64. Pumphrey, R.S., Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. Clin Exp Allergy, 2000. 30(8): p. 1144-50.
65. Macdougall, C.F., A.J. Cant, and A.F. Colver, How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. Arch Dis Child, 2002. 86(4): p. 236-9.
66. Lasley, M., Comprehensive are in the allergy/asthma office. Allergic disease prevention and risk factor identification. Immunol Allergy Clin North Am, 1999. 19: p. 149-159.
67. Dutau, G.R., 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: p. 233-8.
68. Stoger, P. and B. Wuthrich, 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(4): p. 399-407.
69. Ulbrecht, M., et al., High serum IgE concentrations: association with HLA-DR and markers on chromosome 5q31 and chromosome 11q13. J Allergy Clin Immunol, 1997. 99(6 Pt 1): p. 828-36.
70. De Swert, L.F., Risk factors for allergy. Eur J Pediatr, 1999. 158(2): p. 89-94.
71. Host, A., S. Husby, and O. Osterballe, A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. Incidence, pathogenetic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. Acta Paediatr Scand, 1988. 77(5): p. 663-70.
72. Kuitunen, M., E. Savilahti, and A. Sarnesto, Human alpha-lactalbumin and bovine beta-lactoglobulin absorption in infants. Allergy, 1994. 49(5): p. 354-60.
73. Kanny, G.M.-V.D., Sergeant P, Hatahet R., Diversification de l'alimentation de l'enfant. Applications au cas de l'enfant de famille atopique. Médecine et Nutrition, 1996. 3(32): p. 127-131.
74. Shirakawa, T., et al., The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. Science, 1997. 275(5296): p. 77-9.
75. Wang, J.Y., Polyamines and cytoskeletal proteins in intestinal epithelial cell migration. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1998. 13: p. S257-S261.
76. Romagnani, S., T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. 85(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
77. Dutau, G.R.F., Allergie à l'arachide. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2001. 41: p. 187-198.
78. De Montis, G., et al., [Peanut sensitization and oily solution vitamin preparations]. Arch Pediatr, 1995. 2(1): p. 25-8.
79. Guerin, B.G.L., L'arachide. L'une des principales sources d'allergènes alimentaires. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 1995. 35(1): p. 39-43.

80. Rancé, F. and G. Dutau, Aspects pratiques de l'allergie à l'arachide: du diagnostic à la prévention. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 1998. 38(10): p. 896-899.
81. Sampson, A.P., IL-5 priming of eosinophil function in asthma. Clinical and Experimental Allergy, 2001. 31(4): p. 513-517.
82. Sampson, H.A., Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999. 103(5): p. 717-728.
83. Sampson, H.A., Clinical practice. Peanut allergy. N Engl J Med, 2002. 346(17): p. 1294-9.
84. Burks, A.W., et al., Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. J Allergy Clin Immunol, 1991. 88(2): p. 172-9.
85. Burks, A.W., et al., Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. J Allergy Clin Immunol, 1992. 90(6 Pt 1): p. 962-9.
86. Burks, A.W., et al., Epitope specificity and immunoaffinity purification of the major peanut allergen, Ara h I. J Allergy Clin Immunol, 1994. 93(4): p. 743-50.
87. Burks, A.W., et al., Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara h II. J Allergy Clin Immunol, 1995. 95(2): p. 607-11.
88. Maleki, S.J., et al., The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(4): p. 763-8.
89. Beyer, K., et al., Effects of cooking methods on peanut allergenicity. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(6): p. 1077-81.
90. Mondoulet, L.D., M. -F. Ah-Leung,S. Paty,E. Scheinmann, P. Wal, J. -M. and Bernard,H., Influence des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2003. 43(8): p. 486-491.
91. Hourihane, J.O., T.P. Dean, and J.O. Warner, Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. Bmj, 1996. 313(7056): p. 518-21.
92. Zimmerman, B., S. Forsyth, and M. Gold, Highly atopic children: formation of IgE antibody to food protein, especially peanut. J Allergy Clin Immunol, 1989. 83(4): p. 764-70.
93. Kanny, G., L. Guerin, and D.A. Moneret-Vautrin, [Risk of serious acute asthma due to lupine flour associated with peanut allergy]. Rev Med Interne, 2000. 21(2): p. 191-4.
94. Yanes, E.I., D, Owen, DF. Ballester, D, Chemical and nutritional evaluation of sweet lupines. Ann Nutr Metab, 1983. 27: p. 513-520.
95. Marss, T., Lupin based food. Health Bull, 1996. 64: p. 366-367.
96. Helf, S.L., R.F. Lemanske, Jr., and R.K. Bush, Adverse reaction to lupine-fortified pasta. J Allergy Clin Immunol, 1994. 94(2 Pt 1): p. 167-72.
97. Guttierez, D.C., A. Duran, S. Delchgo, J. Guardia, P, Matinez, R, Contact urticaria from lupin. Contact Dermatitis, 1997. 36: p. 311.
98. Dutau, G.R., F. Michaud, A. Juchet and Brémont, F, Farines et allergie : les pièges à ne pas méconnaître: Flour and allergy: pitfalls which must be

recognized. revue Française Allergologie et d'Immunologie Clinique, 2002. 42(3): p. 289-298.
99. Bernhisel-Broadbent, J., S. Taylor, and H.A. Sampson, Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory correlates. J Allergy Clin Immunol, 1989. 84(5 Pt 1): p. 701-9.
100. Leduc, V.V., C. Kanny, G. Guerin, L. Moneret-Vautrin, DA, Characterisation of lupine flour allergens by SDS-PAGE and 2D-Electrophoresis followed by immunoblotting. J Allergy Clin Immunol, 1999. 103: p. 103.
101. Giovannini, L.B., T. Noormahomed, M.T. Albertini, M and Boutté, P, L'allergie aux Rosacées chez l'enfant : à propos de vingt-deux cas. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 2004. 44(8): p. 625-633.
102. Crespo, J.F., et al., Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. Pediatr Allergy Immunol, 1995. 6(1): p. 39-43.
103. Hamada, Y., Y. Nagashima, and K. Shiomi, Identification of collagen as a new fish allergen. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. 65(2): p. 285-91.
104. Elsayed, S. and K. Aas, Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1971. 40(3): p. 428-38.
105. Elsayed, S. and H. Bennich, The primary structure of allergen M from cod. Scand J Immunol, 1975. 4(2): p. 203-8.
106. Van Do, T., et al., The major allergen (parvalbumin) of codfish is encoded by at least two isotypic genes: cDNA cloning, expression and antibody binding of the recombinant allergens. Mol Immunol, 2003. 39(10): p. 595-602.
107. Lindstrom, C.D., et al., Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (Salmo salar). Scand J Immunol, 1996. 44(4): p. 335-44.
108. Bugajska-Schretter, A., et al., Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca2+ depletion. J Allergy Clin Immunol, 1998. 101(1 Pt 1): p. 67-74.
109. Shiomi, K.H., S. Ishikawa, M. Shimakura, K. and Nagashima, Y., Identification of parvalbumin as an allergen in horse mackerel muscle. Fisheries Sci, 1998. 64: p. 300-304.
110. Sato, K., Yoshiyama, R., Sato, M., and Ikeda, S., A simplified method for determing collagen in fish muscle. Nippon suisan Gakkaishi, 1986. 52: p. 889-893.
111. Morali, A., Allergies aux protéines du lait de vache en pédiatrie. Revue Française des Laboratoires, 2004. 2004(363): p. 47-55.
112. Viola, S. and F. Sarrio, Traitement diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. EMC-Pédiatrie, 2004. 1(4): p. 335-340.
113. Host, A., Frequency of cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. 89(6 Suppl 1): p. 33-7.
114. Taylor, S.L. and S.B. Lehrer, Principles and characteristics of food allergens. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996. 36(Suppl): p. S91-118.
115. Aalberse, R.C., J. Akkerdaas, and R. van Ree, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy, 2001. 56(6): p. 478-90.
116. Eriksson, N.E., H. Formgren, and E. Svenonius, Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. Allergy, 1982. 37(6): p. 437-43.
117. Pauli, G., et al., Celery sensitivity: clinical and immunological correlations with pollen allergy. Clin Allergy, 1985. 15(3): p. 273-9.

118. Anibarro, B., M.C. Garcia-Ara, and C. Pascual, Associated sensitization to latex and chestnut. Allergy, 1993. 48(2): p. 130-1.
119. Garcia Ortiz, J.C., P. Cosmes Martin, and A. Lopez-Asunolo, Melon sensitivity shares allergens with Plantago and grass pollens. Allergy, 1995. 50(3): p. 269-73.
120. Lavaud, F., et al., Allergy to latex, avocado pear, and banana: evidence for a 30 kd antigen in immunoblotting. J Allergy Clin Immunol, 1995. 95(2): p. 557-64.
121. Niinimaki, A., M. Hannuksela, and S. Makinen-Kiljunen, Skin prick tests and in vitro immunoassays with native spices and spice extracts. Ann Allergy Asthma Immunol, 1995. 75(3): p. 280-6.
122. Wuthrich, B., J. Stager, and S.G. Johansson, Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. Allergy, 1990. 45(8): p. 566-71.
123. Moneret-Vautrin, D.A., et al., Les allergènes végétaux alimentaires Allergies associées et réactions croisées. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 1997. 37(3): p. 316-324.
124. Yeang, H.Y., Prevalence of latex allergy may be vastly overestimated when determined by in vitro assays. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. 84(6): p. 628-32.
125. Vuitton, D.A., Allergic crossreactions. General and practical aspects. Clin Rev Allergy Immunol, 1997. 15(4): p. 367-74.
126. Malandain, H., Quelle valeur clinique accorder aux résultats chiffrés des dosages d'IgE spécifiques ? Immuno-analyse et Biologie spécilisée, 2003. 18(3): p. 144-151.
127. De Groot, H., et al., Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach, and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains. Allergy, 1996. 51(10): p. 712-8.
128. Koppelman, S.J., et al., Anaphylaxis caused by the unexpected presence of casein in salmon. Lancet, 1999. 354(9196): p. 2136.
129. Brenna, O., et al., Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. J Agric Food Chem, 2000. 48(2): p. 493-7.
130. Sanchez, C. and S. Frément, Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2003. 43: p. 13-20.
131. Kitagawa, S., et al., Relative allergenicity of cow's milk and cow's milk-based formulas in an animal model. Am J Med Sci, 1995. 310(5): p. 183-7.
132. Ermel, R.W., et al., The atopic dog: a model for food allergy. Lab Anim Sci, 1997. 47(1): p. 40-9.
133. Helm, R.M., et al., A neonatal swine model for peanut allergy. J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(1): p. 136-42.
134. Atkinson, H.A., et al., Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization. Food Chem Toxicol, 1996. 34(1): p. 27-32.
135. Li, X.M., et al., A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2000. 106(1): p. 150-158.
136. Herz, U., H. Renz, and U. Wiedermann, Animal models of type I allergy using recombinant allergens. Methods, 2004. 32(3): p. 271-280.

137. Morafo, V., et al., Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential T(H)2-T(H)1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. 111(5): p. 1122-1128.
138. Bernhisel-Broadbent, J., Allergenic cross-reactivity of foods and characterization of food allergens and extracts. Ann Allergy Asthma Immunol, 1995. 75(4): p. 295-303; quiz 304-7.
139. Romano, C.F., A. Tarallos, S, Allergic reaction to lupine seed (lupinus albus). Allergy, 1997. 52: p. 37.
140. McCaskill, A.C., C.S. Hosking, and D.J. Hill, Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin. Immunology, 1984. 51(4): p. 669-77.
141. Poulsen, O.M., J. Hau, and J. Kollerup, Effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analysed by a murine anaphylactic shock model. Clin Allergy, 1987. 17(5): p. 449-58.
142. Clayton, D.E. and W. Busse, Anaphylaxis to wine. Clin Allergy, 1980. 10(3): p. 341-3.
143. Pastorello, E.A., et al., Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(2): p. 350-9.
144. Bauza, T., G. Kanny, and A. Blaise, Les amines biogènes des vins: métabolisme et toxicité. Bull. OVI, 1995: p. 767-768.
145. Pradalier, A., C. Artigou, and J. Dry, Alcohol and urticaria. Ann Med Interne (Paris), 1985. 136(3): p. 216-8.
146. Drevets, C.C. and P.M. Seebohm, Dermatitis from alcohol. J Allergy, 1961. 32: p. 277-82.
147. Przybilla, B. and J. Ring, Anaphylaxis to ethanol and sensitization to acetic acid. Lancet, 1983. 1(8322): p. 483.
148. Rilliet, A., N. Hunziker, and R. Brun, Alcohol contact urticaria syndrome (immediate-type hypersensitivity). Case report. Dermatologica, 1980. 161(6): p. 361-4.
149. Dearman, R.J. and I. Kimber, Determination of protein allergenicity: studies in mice. Toxicol Lett, 2001. 120(1-3): p. 181-6.
150. Dearman, R.J., et al., Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose-response analyses. Clin Exp Allergy, 2003. 33(11): p. 1586-94.
151. Untersmayr, E., et al., Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(3): p. 616-23.
152. Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs, Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat Biotechnol, 1996. 14(10): p. 1269-73.
153. Fu, T.J., Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. Ann N Y Acad Sci, 2002. 964: p. 99-110.
154. Fu, T.J., U.R. Abbott, and C. Hatzos, Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study. Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. J Agric Food Chem, 2002. 50(24): p. 7154-60.
155. Untersmayr, E., et al., The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(2): p. 377-82.

156. Sakai, K., et al., Effects of pH variation and NaCl on in vitro digestibility of cow's milk proteins in commercially available infant formulas. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2000. 46(6): p. 325-8.
157. Magnan, A. and D. Vervloet, Allergies: determinants of T2 lymphocyte polarization and desensitization mechanisms. Rev Mal Respir, 1997. 14(3): p. 173-81.
158. Li, X.M., et al., Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. Journal of Immunology, 1999. 162(5): p. 3045-3052.
159. Lucas, A. and R.N. Hamburger, Immune response gene control of the murine antibody response to the phospholipase A2 of honey bee venom. Immunogenetics, 1986. 23(6): p. 417-20.
160. Martin, T.R., et al., Role of mast cells in anaphylaxis. Evidence for the importance of mast cells in the cardiopulmonary alterations and death induced by anti-IgE in mice. J Clin Invest, 1989. 83(4): p. 1375-83.
161. Dombrowicz, D., et al., Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. Cell, 1993. 75(5): p. 969-76.
162. Naito, K., et al., Recombinant soluble form of the human high-affinity receptor for IgE prevents anaphylactic shock in mice. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1996. 97(3): p. 773-780.
163. Oettgen, H.C., et al., Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. Nature, 1994. 370(6488): p. 367-70.
164. Oshiba, A. and E.W. Gelfand, Antigen-dependent regulation of IgE antibody production by human antigen-specific B cells. Journal of Immunology, 1996. 157(11): p. 4870-4875.
165. Zinkernagel, R.M., Uncertainties - discrepancies in immunology. Immunol Rev, 2002. 185: p. 103-25.
166. Roy, K., et al., Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nature Medicine, 1999. 5(4): p. 387-391.
167. Newman, M.J., Preface. Adv Drug Deliv Rev, 1998. 32(3): p. 153-154.
168. Castells, M., Update on mast cells and mast cell precursors and hypersensitivity responses. Allergy Asthma Proc, 1997. 18(5): p. 287-92.
169. Miyajima, I., et al., Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. J Clin Invest, 1997. 99(5): p. 901-14.
170. Bruschi, F., et al., Anaphylactic response to parasite antigens: IgE and IgG1 independently induce death in Trichinella-infected mice. International Archives of Allergy and Immunology, 1999. 119(4): p. 291-296.
171. Park, H.J., Y.S. Choi, and C.E. Lee, Identification and activation mechanism of the interleukin-4-induced nuclear factor binding to the CD23(b) promoter in human B lymphocytes. Molecules and Cells, 1997. 7(6): p. 755-761.
172. Vaz, N.M. and B.B. Levine, Immune responses of inbred mice to repeated low doses of antigen: relationship to histocompatibility (H-2) type. Science, 1970. 168(933): p. 852-4.

173. Snider, D.P., et al., Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. J Immunol, 1994. 153(2): p. 647-57.
174. Dutau, G., Facteurs de risque des allergies graves. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 2004. 44: p. 323-335.
175. Kanny, G.M.-V., D. Flabbée, J. Parisot, L., Facteurs de risque du choc anaphylactique alimentaire. JACI, 2002. 109(4): p. 743.
176. Sheffer, A.L. and K.F. Austen, Exercise-induced anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol, 1980. 66(2): p. 106-11.
177. Gerth van Wijk, R.d.G., H. Bogaard, JM., Drug-dependant exercise-induced anaphylaxis. Allergy, 1995. 50: p. 992-994.
178. Satter, M.A., et al., Low-protein diet induces oral tolerance to ovalbumin in mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2002. 48(1): p. 51-8.
179. Fritsche, R., Induction of oral tolerance to cow's milk proteins in rats fed with a whey protein hydrolysate. Nutrition Research, 1998. 18(8): p. 1335-1341.
180. Gaboriau-Routhiau, V. and M.C. Moreau, Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Pediatr Res, 1996. 39(4 Pt 1): p. 625-9.
181. Pecquet, S., et al., Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(3): p. 514-21.
182. Strober, W., et al., Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: New insights from murine models of inflammation. Scandinavian Journal of Immunology, 1998. 48(5): p. 453-458.
183. Kiyono, H., et al., Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. J Exp Med, 1982. 155(2): p. 605-10.
184. Eriksson, K., et al., Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. Infect Immun, 2003. 71(4): p. 1740-7.
185. Isaka, M., et al., Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. Vaccine, 2004. 22(23-24): p. 3061-8.
186. Lei, H.Y., S.H. Lee, and S.H. Leir, Antigen-induced anaphylactic death in mice. Int Arch Allergy Immunol, 1996. 109(4): p. 407-12.

8- SOURCES ELECTRONIQUES:

1- Cercle d'Investigation Cliniques et Biologiques en Allergie Alimentaire (CICBAA) : http://www.cicbaa.com

2- Agence Française de Sécurité Sanitaire de Aliments (AFSSA) : http://www.afssa.fr

3- Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA): http://www.inspection.gc.ca

4- Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) : http://www.insee.fr

Commission de Codex Alimentarius (CAC) : http://www.codexalimentarius.net

9- ABREVIATIONS

Ac : anticorps

Ag : antigène

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

alun: hydroxyde d'aluminium

ANOVA : analyse de variance

CDD : cardohydrates

CMH : complexe majeur d'histo-compatibilité

CPA : cellule présentatrice de l'antigène

FAO: Food and agriculture organisation

ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

GG : gavage gastrique

i.p : intrapéritonéale

i.g : intragastrique

IL : interleukine

NK : natural Killer ou cellules tueuses naturelles

OMS : organisation modiale de la santé

OGM : organisme génétiquement modifié

PAF : platelet Activating factor

PBS: phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)

PG: prostaglandine

PNB: polynucléaire basophile

PNE: polynucléaire éosinophile

PNN: polynucléaire neutrophile

OPD: ortho-phénylène-diamine

Th: Cellules T helper

TC: toxine cholérique

10- LEXIQUE

Atopie: tendance héréditaire ou constitutionnelle à développer des manifestations d'hypersensibilité immédiates telles que l'asthme allergique, le rhume des foins, l'urticaire, l'eczéma constitutionnel et se traduisant par une sensibilité anormale à des substances (allergènes) n'induisant pas ce type de réaction chez les sujets sains non atopiques.

Allergène: substance susceptible de provoquer une réaction allergique, équivalant sur le plan immunologique, au terme antigène, la différence étant fonction de la réactivité du sujet. Il s'agit le plus souvent de produits organiques d'origine végétale ou animale (pollens, acariens de la poussière, poils d'animaux domestiques, aliments).

Anticorps: cellules synthétisées par les plasmocytes et les lymphocytes B, après l'introduction d'antigènes dans l'organisme. Le rôle des anticorps est de neutraliser et de détruire l'antigène en activant le complément (voir à ce mot) présent dans le sérum.

Antigène: substance qui, après son introduction dans l'organisme, induit le développement d'une réponse immunitaire spécifique soit par la production d'anticorps (immunoglobulines), soit en développant une immunité à médiation cellulaire (sensibilisation des lymphocytes).

Anaphylaxie: autre terme définissant l'allergie de type immédiat mais habituellement réservé aux manifestations cliniques brutales (exemple du choc anaphylactique aux venins d'hyménoptères, aux aliments et aux médicaments).

Basophile: Polynucléaire du sang sur lequel se fixent les IgE spécifiques. Le contact de l'allergène et de l'IgE provoque une dégranulation qui conduit à la libération des médiateurs à l'origine de l'inflammation (dont l'histamine).

Complément: le complément représente avec les anticorps, l'élément essentiel du système humoral de défense contre les agents infectieux. Il se compose d'une vingtaine de protéines circulantes capables d'interagir avec certaines membranes biologiques. L'activation réalisée en cascade entraîne des répercussions biologiques lésionnelles, telles que la lyse cellulaire, bactérienne ou virale.

Éosinophiles: variété de leucocytes à gros noyau et à grosses granulations faciles à colorer par l'éosine. Leur nombre normal (500 à 600 par ml) est augmenté (hyperéosinophilie) dans les états allergiques, les maladies parasitaires, certains cancers et autres maladies systémiques. Ils sont capables de synthétiser de nombreux médiateurs dont les cytokines et les leucotriènes.

Histamine: substance dérivée de l'imidazole présente dans les tissus animaux. L'histamine provoque (entre autres) la contraction des artérioles, des fibres lisses et la dilatation des capillaires, ce qui se traduit par un processus inflammatoire et un **bronchospasme** dans le cas de

l'**asthme**. Au cours des réactions allergiques, elle est sécrétée par les polynucléaires basophiles et les mastocytes qui stockent l'histamine dans leurs granulations.

Immunoglobulines: on a appelé immunoglobulines, les protéines (gammaglobulines) existant dans le sérum sanguin et dans divers liquides biologiques qui sont douées d'une activité d'anticorps. Elles sont réparties en cinq classes : immunoglobuline G ou IgG, A ou IgA, M ou IgM, D ou IgD, E ou IgE.

IgG (environ 70 % des immunoglobulines) : elles favorisent la phagocytose et interviennent dans la lutte contre les bactéries et les virus. Transmises par la mère à l'enfant, elles décroissent pendant les premières années (ce qui explique la sensibilité des nourrissons aux agents pathogènes) pour croître ensuite et rester (normalement) stable à l'âge adulte. Elles traversent facilement la paroi des vaisseaux sanguins, circulant ainsi aisément dans tout l'organisme ; elles traversent également le placenta, conférant alors une immunité passive au foetus. Les IgG sont produites de façon massive par des plasmocytes, issus de la différenciation de lymphocytes B à la suite d'une stimulation antigénique.

IgA : (10 à 20 % de l'ensemble) : elles sont surtout localisées dans les sécrétions de l'organisme (sécrétions, nasales, pharyngées, respiratoires, larmes).

IgM (10 % des immunoglobulines sériques): intra-vasculaires, elles ont pour rôle principal d'agglutiner les bactéries, elles sont très efficaces dans la lutte contre l'infection.

IgD (0,2 % des immunoglobulines sériques) : ces immunoglobulines jouerait un rôle dans l'activation des lymphocytes B.

IgE (0,004 % des immunoglobulines sériques) sont presque toujours augmentées dans les manifestations atopiques (allergiques) et il existe des IgE spécifiques de tel ou tel allergène. Les molécules d'IgE peuvent se fixer sur la membrane des mastocytes et des basophiles grâce à des récepteurs spécifiques ; par ailleurs, été mis en cause dans la production des IgE, un chromosome (11q13) ont ainsi que le gène de l'interleukine 4 (IL4).

Leucocyte (synonyme : globule blanc): cellule sanguine comportant un noyau (nucléée), on distingue les mononucléaires (lymphocytes et monocytes) et les polynucléaires (dont le noyau paraît multiple). L'introduction d'un antigène dans l'organisme déclenche une réponse immunitaire qui peut être humorale, cellulaire ou les deux à la fois. La réponse immunitaire suppose une reconnaissance par le système immunitaire de la substance antigénique et la sélection d'un certain nombre de cellule dites «immunologiquement compétentes», capables d'organiser cette réponse. Les cellules intervenant dans la réponse immunitaire sont essentiellement : les macrophages et les lymphocytes.

Présents dans la circulation générale et dans les organes lymphoïdes, les lymphocytes constituent environ 25 % des globules blancs chez l'adulte normal. Les deux types de lymphocytes, B et T, diffèrent par leurs marqueurs et par leurs fonctions : les lymphocytes B dépendent de la moelle osseuse et portent des anticorps de membrane ; les lymphocytes T dépendent du thymus et sont responsables de l'immunité à médiation cellulaire.

Lymphocytes B: cellules qui, en présence de l'antigène, se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Lymphocytes T: cellules qui, en présence de l'antigène, se mobilisent et se multiplient sans sécrétion d'anticorps. Elles sont le support de l'immunité à médiation cellulaire et réagissent avec l'antigène qui les a sensibilisées. Les lymphocytes T coopèrent avec les lymphocytes B dans la régulation de la réponse immunitaire. Certains lymphocytes à longue durée de vie, dits lymphocytes mémoires, jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Il existe trois types de lymphocytes T :

Les **lymphocytes "helpers"** (qui aident) favorisent la formation d'anticorps par les lymphocytes B ainsi que le clonage des lymphocytes T cytotoxiques ;

Les **lymphocytes "suppressors"** (qui suppriment) régularisent l'action des lymphocytes T helpers et des lymphocytes B ;

Les **lymphocytes "killers"** (cytotoxiques) détruisent (lysent) les cellules dont la membrane portent un antigène qu'ils sont capables d'identifier grâce à des récepteurs spécifiques.

Macrophages: cellules qui jouent un rôle très important dans la destruction de l'antigène et interviennent à plusieurs niveaux de la réponse immunologique. Ils sont capables de transformer certains antigènes afin de permettre aux lymphocytes B de les reconnaître. Ils participent à la réponse immunitaire grâce à des produits de sécrétion actifs sur les lymphocytes T. Ils interviennent comme modérateurs de la coopération cellulaire entre les lymphocytes B et T. Les macrophages reçoivent en retour des informations des lymphocytes T par l'intermédiaire des lymphokines qui confèrent aux macrophages une activité cytolytique ou suppressive. Enfin les macrophages sont cytotoxiques. Le message antigénique libéré par les macrophages est immédiatement capté par les lymphocytes dont les cellules souches se trouvent dans la moelle. Les macrophages dérivent des monocytes (voir ce mot) du sang, ils se fixent dans les ganglions lymphatiques, la rate, le foie (cellules de Küppfer).

Mastocytes: cellules tissulaires qui, comme le basophile, possèdent des granulations qui libèrent des médiateurs de l'inflammation après activation lors du contact entre l'IgE spécifiques fixée à leur membrane et l'allergène.

Médiateur chimique ou neuromédiateur (synonyme : neurotransmetteur): messager chimique destiné aux récepteurs d'information qui déclencheront en retour un ou plusieurs processus réactionnels. Le médiateur chimique permet une véritable communication entre différentes cellules et l'application d'un programme déterminé, susceptible d'être adapté et modifié, en fonction d'un apprentissage comme on le constate au cours des réactions immunitaires. Les principaux médiateurs chimiques sont : l'acétylcholine, l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine, la sérotonine, les cytokines (qui véhiculent les messages, comme l'interkeuline 2 qui transforme les lymphocytes T inactifs en agents éliminateurs), l'histamine (intervenant au cours du mécanisme inflammatoire et dans les réactions d'hypersensibilité). Certains comme les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes sont des dérivés de l'acide arachidonique. La libération des médiateurs (comme par exemple, l'adrénaline en cas d'agression et de stress) est aussi sensible à la nature de la perception par le sujet de son environnement physique et psychologique.

Les cellules nerveuses libèrent également des médiateurs chimiques sous l'influence de l'excitation et transmettent l'influx nerveux d'un neurone à l'autre (par l'intermédiaire de la synapse).

Monocytes: grands globules blancs qui naissent dans la moelle osseuse, puis se transforment en macrophages.

Plasmocytes: Cellules qui proviennent de la différenciation terminale des lymphocytes B et qui sécrètent les immunoglobulines (anticorps).

11- PUBLICATION

ELSEVIER

International Immunopharmacology 5 (2005) 1427–1435

International Immunopharmacology

www.elsevier.com/locate/intimp

Peanut-lupine antibody cross-reactivity is not associated to cross-allergenicity in peanut-sensitized mouse strains

Awatif Lifrani[a], Michel Dubarry[a], Michèle Rautureau[a], Najat Aattouri[a], Prosper N. Boyaka[b], Daniel Tomé[a,*]

[a]*UMR INRA 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, F75231 Paris Cedex 05, France*

[b]*Department of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA*

Received 6 November 2004; received in revised form 20 March 2005; accepted 22 March 2005

Abstract

Background: Peanut hypersensitivity is one of the most common food allergies and one of the most common causes of death by food anaphylaxis in children and adults. Cross-reactivity of peanut-specific antibody (Ab) with other legumes is frequently demonstrated but it still remains to be demonstrated whether these responses could lead to clinical signs of cross-allergenicity.
Objective: We sought to evaluate peanut-specific serum IgE and IgG1 antibody (Ab) responses and anaphylactic reaction in mice strains and to assess both cross-reactivity and cross-allergenicity of peanut and lupine.
Methods: Four mice strains (i.e., C3H, BALB/c, CBA and SJL) were sensitized to peanut by intraperitoneal (ip) injection of crude peanut protein extract with alum. Other groups were given oral peanut extract without adjuvant. Peanut-specific antibodies (Abs) and anaphylactic responses to peanut challenge were examined.
Results: The C3H, CBA (H-2^k) and BALB/c (H2-^{d}) mice exhibited high levels of peanut-specific serum IgE, IgG1 Ab responses after the intra-peritoneal sensitization. Only the two strains of mice in the H-2^k background developed anaphylactic symptoms upon intra-peritoneal challenge with crude peanut protein extract. While cross-reactivity of peanut and lupine was confirmed by ELISA, no clinical symptom of cross-allergenicity was seen after challenge with lupine. Mice that were given oral peanut showed only increase in peanut-specific IgG2a, but no IgE or IgG1 Abs and failed to develop anaphylactic reactions following injection of either peanut or lupine protein.
Conclusion: These results show that mice of different genetic backgrounds can be sensitized to peanut by ip injection to develop anti-peanut Abs that cross react with lupine. In addition, cross-allergenicity may not directly correlate with the presence of cross-reactive Abs since no clinical symptoms of cross-allergenicity was seen after ip challenge with lupine.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Peanut; Lupine; Allergy; Cross-reactivity; Allergen

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44081718; fax: +33 1 44087248.
E-mail address: tome@inapg.fr (D. Tomé).

1567-5769/$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.intimp.2005.03.018

1. Introduction

Peanut is a major food allergen and the most common cause of fatal and near-fatal food-related anaphylaxis [1–2]. The allergy to peanut is characterized by more severe symptoms than other food allergies and by a high rate of symptoms on minimal contact [3,4]. The incidence of peanut, and food allergies in general, has increased in the recent decades. In contrast, little progress was made for prevention and treatment of peanut allergy. Thus, avoidance, the only effective preventive treatment, is extremely difficult because of the widespread and often disguised use of peanuts in the food industry and others [5]. Only a small number of peanut allergic patients carries pharmacologic agent that interfere with the consequences of mediator release (i.e., epinephrine) and even timely injection of this may not prevent death [6,7]. Desensitization by injection of aqueous peanut extracts showed an unfavourable risk–benefit ratio [8]. An anti-IgE antibody therapy was shown to increase the threshold of sensitivity to peanut challenge that could be protective against most accidental ingestion of peanuts [9], although its efficacy against skin and other potential routes of peanut exposure remain to be demonstrated. The genetic and environment factors that lead to abnormal production of IgE to peanut remains poorly understood. In addition, an increasing number of reports suggests that other parameters, including IgG [10] and Th1 cytokines play a role in allergic reactions [11].

The problem of peanut allergy is further enhanced by the possibility of cross-reactive reactions between peanut and the other members of the legume family. In vitro studies have shown that more than one out of three peanut allergic patients possess IgE that react with other legumes [12] and extensive immunologic cross reactivities among legumes have been demonstrated [13]. Several clinical reports suggested that peanut allergic subjects developed allergic reaction upon contact with other legumes including soybean, lens, or lupine. However, only rare clinical cross-reaction were demonstrated by double-blind, placebo-controlled food challenges (DBPCFC) studies [14,15]. In contrast with these studies, others have suggested that the risk of clinical manifestations of allergy following exposure of peanut allergic patients to lupine is higher than with other legumes [16,17]. However, the mechanisms underlying these reactions remain poorly understood.

Mouse models have been extensively used to study human diseases. More specifically, the human and murine immune systems share mechanisms involved in allergic responses. The genetic background plays an important role in human atopy. Murine studies have shown that environment allergic sensitization to peanut allergen is strain-dependent [4]. For example, C3H (H-2^k) mice were shown to be sensitive to food allergy [4,18,19] but not BALB/c (H-2^d) mice [19]. Few mouse studies examined allergic reactions due to cross-reactivity with new food allergens such as lupine. In this regard, a large portion of the European population is now being exposed to lupine since the generalization of its use as an additive to wheat flour. The aim of the present study was to delineate potential lupine-peanut cross-reactivity and cross-allergenicity on peanut-sensitized murine models. For that purpose four strains (C3H, BALB/c, CBA and SJL) of inbred mice with different MHC were sensitized to peanut to address the potential role of other MHC haplotypes as well as other genetic factors on allergic reaction to new food allergens. Serum levels of Abs reacting with peanut and lupine were characterized in vitro as well as in vivo anaphylactic reaction after ip challenge with peanut or lupine.

2. Materials and methods

2.1. Peanut and lupine protein extracts

Sweet lupine proteins extract was prepared by incubating lupine flour (TERRENA, Ancenis, France) in sodium bicarbonate (pH 9.4) under stirring. The protein extract was then dialyzed against PBS, concentrated by filtration and aliquot stored at −70 °C. The peanut protein extract was obtained by using a published method [20] with modifications. Briefly, the kernels (100 g) were ground in a blender and the ground peanuts mixed with 250 ml of acetone (diethyl ether) and stirred for 1 h at 4 °C. The suspension was allowed to settle and the acetone decanted and discarded. The pellet was resuspended in 250 ml of diethyl ether and allowed to settle. This step was repeated five times and the defatted peanut extract was separated from the diethyl ether by aspiration and

air-dried overnight (24 h). An aqueous extract of the defatted peanuts was prepared by adding 300 ml of 0.1 M ammonium bicarbonate adjusted the pH to 8. The mixture was stirred for 20 h at 25 °C. The extract was clarified by centrifugation for 40 min at 48,000 $\times g$ at 4 °C, freeze-dried and stored at −4 °C. Gradients 4–15% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide mini gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) were used to compare protein composition in lupine and peanut extracts. For this purpose, lupine and peanut samples containing 30 μg of proteins were mixed with loading buffer (Tris HCl 1M, glycerol, SDS and 2-mercapto-ethanol) and heated 5 min at 90 °C. Samples and a molecular weight marker were then loaded into the gel and the electrophoresis was performed for 1 h at 100 mV. The protein bands were visualized with 0.1% Coomassie brilliant blue and the images analyzed with the Kodak 1D 3.0 software (Eastman Kodak, Rochester, NY).

2.2. Mice, peanut sensitization and sample collection

The animal protocol complied with NIH guidelines. Mice 6 weeks old from C3H/HeSn (H-2^k), CBA/j (H-2^k), BALB/c (H-2^d), and SJL/J (H-2^s) strains were purchased from Harlan Nerediand France Laboratory. The mice were fed ad libitum a standard laboratory food (cereal, 839 g/kg; vitamins and minerals, 41 g/kg; fish proteins, 40 g/kg; and vegetable proteins, 80 g/kg; Extralabo; APAE-INRA, Jouy en Josas, France). For oral sensitization, mice ($n=10$ per group) received weekly (for 24 h) during three months 3 g of their habitual diet containing 2.5 mg of peanut extract and blood samples were collected every fifteen days. For intra-peritoneal sensitization, mice ($n=10$ per group) received 150 μl of 7 μg/ml peanut protein in PBS with $Al(OH)_3$ as adjuvant. Mice received four injections at 15 days intervals. Blood samples were collected from each group of mice before and after immunization by retro-orbital puncture all along experimentation. After centrifugation, individual sera were collected and stored at −20 °C.

2.3. In vitro antibody reactivity to peanut and lupine

The level of peanut and lupine IgE, IgG, IgG1 and IgG2a response was determined by ELISA. Microtiter plates (Nunc-maxisorp, France) were coated with peanut or lupine (10 μg/ml in PBS pH 7.4). After an overnight at 4 °C, plates were washed and blocked with 3% BSA PBS for 1 h at 37 °C. Fifty (50) μl of serum samples (Diluted in 1% BSA PBS) was added to the plates and incubated 2 h at 37 °C. Plates were then washed, and incubated for 1 h at 37 °C with 50 μl of 2 μg/ml biotinylated polyclonal specific antibody for IgG (Sigma B9904, France), or biotinylated monoclonal specific antibodies for IgE, IgG1 and IgG2a (Pharmingen, France; 02232D, 02122D and 02012D, respectively). Fifty (50) μl of streptavidin–peroxydase (1:5000 dilution, Sigma E-2886, France) was then added to the plates and incubated for 30 min at 37 °C. After addition of 50 μl of H_2O_2 (30%, 0.25 ml/l, Sigma, France) associated with OPD (0.5 mg/ml, Sigma, France) in a sodium citrate buffer 0.05 M pH 5.1 used as substrate, the reaction was stopped by adding H_2SO_4 (2N). Between each incubation, the plates were washed with PBS containing 0.01% of tween 20. The absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (Bio-Tek Instruments).

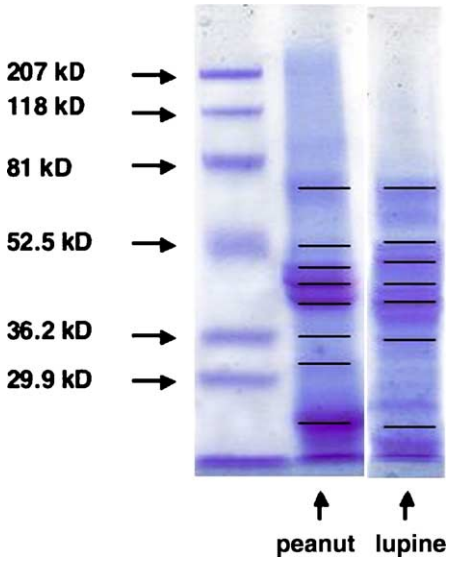

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of peanut and lupine protein extracts. The protein bands visualized by Coomassie brilliant blue were analyzed in comparison to a molecular weight marker with a Kodak 1 D 3.0 software.

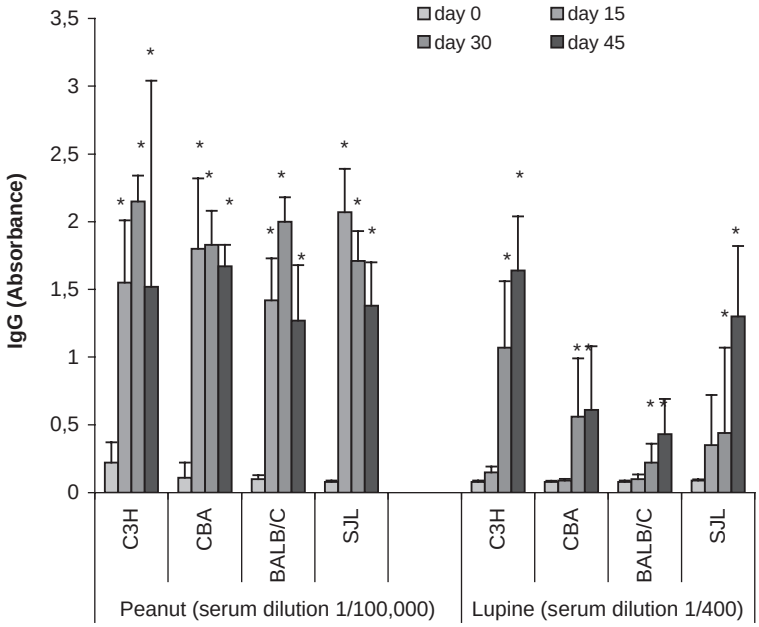

Fig. 2. In vitro reactivity to peanut and lupine antigen of ip peanut-sensitized mice IgG serum antibodies. * Significantly different from day 0 ($P<0.05$).

2.4. In vivo hypersensitivity response to peanut and lupine

Anaphylactic symptoms of mice were evaluated 40 min after ip challenge with 1 mg of peanut or lupine as previously reported [4]. The symptoms were quantified by using the following previously reported scoring system [4]: 0, no symptoms; 1, scratching and rubbing around the nose and head; 2, puffiness around the eyes; pillar erect, reduced activity, and/or decreased activity

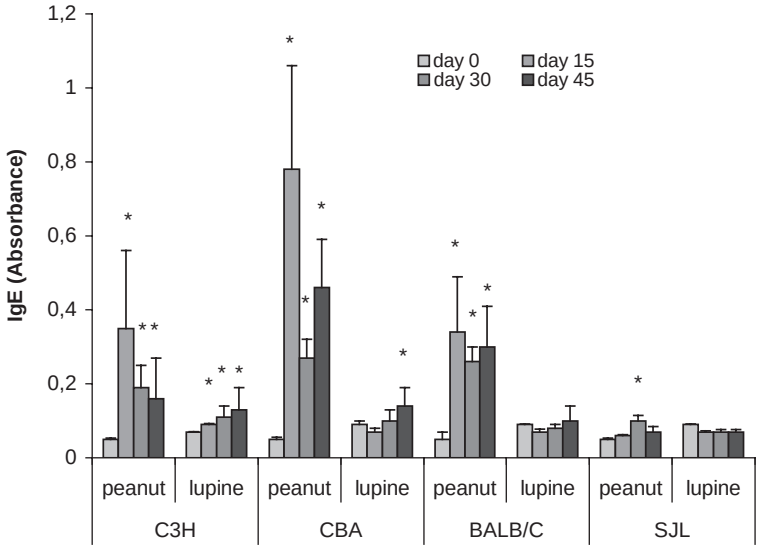

Fig. 3. In vitro reactivity to peanut and lupine of ip peanut-sensitized mice IgE serum antibodies. Serum dilution 1/10. * Significantly different from day 0 ($P<0.05$).

with decreased activity with increased respiratory rate; 3, wheezing, labored respiration, cyanosis around the mouth and the tail; 4, no activity after prodding, or tremor and convulsion; 5, death.

2.5. Statistical analysis

The statistical significance of the data was determined by t test; a value of $p < 0.05$ was considered as significant.

3. Results

A major prerequisite for the development of cross-reactive allergic reaction is the presence of common or cross-reactive antigens (allergens). Thus, we first analyzed the proteins in peanut and lupine extracts to determine to what extent these two members of the botanical family of legumes share common proteins. As reported in Fig. 1, protein bands with the same molecular weight were detected in peanut and lupine extracts at 19, 22, 46, 50 and 76 kDa. The studies described below determined the potential immunological consequences of the shared proteins in mouse responses to lupine after sensitization with peanut proteins.

3.1. Peanut promotes distinct patterns of peanut-specific antibody responses in mouse strains

Most mouse model of peanut allergy involve systemic sensitization in the presence of an adjuvant. Therefore, we first characterized peanut-specific in C3H, CBA, BALB/c and SJL mice after peanut sensitization by ip injection in the presence of alum. This protocol of sensitization promoted strain-dependant IgG, IgG2a, IgG1 and IgE response (Figs. 2 and 3). All the strains presented a peanut-specific IgG response that cross-reacted with lupine (Table 1). The

Table 1
In vitro reactivity to peanut and lupine of ip peanut-sensitized mice IgG2a and IgG1 Ab

		Strain	Absorbance			
			Day 0	Day 15	Day 30	Day 45
IgG2a	Peanut	C3H	0.11 ± 0.04	1.44 ± 1.00*	1.29 ± 0.47*	1.41 ± 0.49*
	(Dilution $1/10^5$)	CBA	0.19 ± 0.10	0.65 ± 0.37*	0.74 ± 0.46*	0.73 ± 0.64*
		BALB/C	0.14 ± 0.04	0.78 ± 0.62*	1.39 ± 0. 29*	1.86 ± 0.83*
		SJL	0.100 ± 0.007	0.76 ± 0.50*	0.55 ± 0.37*	0.62 ± 0.24*
	Lupine	C3H	0.110 ± 0.006	0.11 ± 0.01	0.32 ± 0.25*	0.07 ± 0.53*
	(Dilution 1/400)	CBA	0.11 ± 0.08	0.11 ± 0.01	0.23 ± 0.20	0.20 ± 0.16
		BALB/C	0.11 ± 0.006	0.18 ± 0.24	0.28 ± 0.38	0.40 ± 0.51
		SJL	0.110 ± 0.03	0.14 ± 0.12	0.38 ± 0.59	0.77 ± 0.70*
IgG1	Peanut	C3H	0.43 ± 0.22	2.07 ± 0.36*	1.82 ± 0.29*	1.85 ± 0.26*
	(Dilution $1/10^5$)	CBA	0.12 ± 0.06	1.93 ± 0.56*	2.14 ± 0.10*	1.89 ± 0.26*
		BALB/C	0.21 ± 0.10	1.83 ± 0.40*	2.00 ± 0.18*	1.81 ± 0.10*
		SJL	0.10 ± 0.01	1.79 ± 0.48*	1.73 ± 0.40*	1.66 ± 0.47*
	Lupine	C3H	0.13 ± 0.06	0.46 ± 0.19	1.22 ± 0.14*	2.13 ± 0.34*
	(Dilution 1/400)	CBA	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.10	0.71 ± 0.50*	1.06 ± 0.84*
		BALB/C	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01*	0.36 ± 0.33*	0.65 ± 0.43*
		SJL	0.11 ± 0.01	0.48 ± 0.48*	1.07 ± 0.57*	1.61 ± 0.69*
IgG1/IgG2a	Peanut	C3H	$3.81 \pm 2\ E^{-3}$	$1.43 \pm 9\ E^{-3}$	$1.40 \pm E^{-3}$	$1.31 \pm 3.8\ E^{-3}$
		CBA	$0.61 \pm 2\ E^{-4}$	$2.95 \pm 2\ E^{-3}$	$2.89 \pm 2\ E^{3}$	$2.54 \pm 3\ E^{-3}$
		BALB/C	$1.47 \pm 8\ E^{-4}$	$2.36 \pm 8\ E^{-3}$	$1.44 \pm 7\ E^{-4}$	$0.97 \pm 1.5\ E^{-3}$
		SJL	$0.93 \pm 1\ E^{-5}$	$2.33 \pm E^{-3}$	$3.10 \pm E^{-3}$	$2.69 \pm 1.3\ E^{-3}$
	Lupine	C3H	$1.17 \pm 6E^{-4}$	$2.05 \pm 1.62\ E^{-3}$	$3.76 \pm 4.5\ E^{-3}$	$3.10 \pm 3.4\ E^{-3}$
		CBA	$1.00 \pm 5\ E^{-4}$	$1.53 \pm 1\ E^{-4}$	$3.00 \pm 4.6\ E^{-3}$	$5.20 \pm 5.8\ E^{-3}$
		BALB/C	$0.93 \pm 1\ E^{-4}$	$0.65 \pm 3.9\ E^{-4}$	$1.27 \pm 2.25\ E^{-3}$	$1.62 \pm 3.3\ E^{-3}$
		SJL	$0.96 \pm 1.4\ E^{-4}$	$3.26 \pm 2.4\ E^{-3}$	$2.81 \pm 5.4\ E^{-3}$	$2.09 \pm 4.2\ E^{-3}$

* Significantly different from day 0 ($p<0.05$).

Table 2
Peanut specific antibodies in mice treated orally with peanut

	Strain	Absorbance				
		Day 0	Day 15	Day 30	Day 45	Day 60
IgG	C3H	0.35 ± 0.41	0.35 ± 0.35	0.30 ± 0.17	0.20 ± 0.08	0.18 ± 0.08
(Dilution 1/50)	CBA	0.14 ± 0.01	0.23 ± 0.06*	0.45 ± 0.78	0.23 ± 0.14*	0.18 ± 0.05*
	SJL	0.52 ± 0.39	0.52 ± 0.21	0.46 ± 0.21	0.55 ± 0.28	0.62 ± 0.40
IgG2a	C3H	0.22 ± 0.22	0.58 ± 0.12*	0.49 ± 0.23*	0.38 ± 0.15	0.35 ± 0.13
(Dilution 1/50)	CBA	0.12 ± 0.02	0.35 ± 0.10*	0.48 ± 0.60	0.32 ± 0.24*	0.25 ± 0.10*
	SJL	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.05*	0.14 ± 0.04*	0.22 ± 0.23*	0.21 ± 0.22
IgG1	C3H	0.31 ± 0.34	0.39 ± 0.42	0.29 ± 0.24	0.25 ± 0.24	0.17 ± 0.11
(Dilution 1/50)	CBA	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.06	0.37 ± 0.73	0.14 ± 0.08	0.16 ± 0.08*
	SJL	0.61 ± 0.71	0.89 ± 0.64	0.55 ± 0.66	0.46 ± 0.62	0.52 ± 0.71
IgE	C3H	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.080 ± 0.005	0.080 ± 0.005	0.08 ± 0.004
(Dilution 1/50)	CBA	0.09 ± 0.03	0.080 ± 0.006	0.080 ± 0.005	0.080 ± 0.003	0.080 ± 0.003
	SJL	0.090 ± 0.007	0.090 ± 0.005	0.07 ± 0.01	0.080 ± 0.004	0.080 ± 0.005

* Significantly different from day 0 ($p<0.05$).

IgG response was lower with lupine than with peanut and the lupine IgG response was in the order C3H>SJL>CBA>BALB/c. Peanut-specific IgE response was markedly higher in CBA than in BALB/c and C3H mice and a weak IgE response was observed in SJL mice. CBA, BALB/c and C3H peanut-sensitized mice also showed a weak lupine IgE cross-reactivity whereas no response was detected for SJL mice. The peanut-lupine IgE cross-reactivity in the three strains of mice was in the following order CBA>C3H>BALB/c (Table 1). The peanut and lupine IgG1/IgG2a response ratio were positive when peanut and lupine IgE responses were increased, with the exception of SJL mice for which the IgG1/IgG2a ratio was also positive, even in the absence of peanut IgE responses.

3.2. Different mouse strains display similar patterns of peanut-specific antibody responses to repeated oral peanut doses

Sensitization to food antigens generally occur by ingestion. This led us to address whether the MHC haplotype and other genetic factors also affected sensitization to peanut by the oral route. More specifically, we examined the levels of peanut-specific Abs responses in the serum of C3H, CBA and SJL mice that received oral peanut doses without adjuvant for three months. Our results indicated no difference between the mice strains which all exhibited very low level of peanut-specific IgG2a responses and no IgG1 Abs (Table 2). None of the mouse strains showed peanut-specific serum IgE responses after this oral sensitization (Table 2). Thus, the lack of IgE and presence of IgG2a but not IgG1 Abs suggested that a weekly oral sensitization to peanut could promote Th1 type responses.

3.3. Hypersensitivity response to peanut and lupine of mouse strains sensitized to peanut

The biological significance of peanut sensitization in different mouse strains was further evaluated by measurement of the response to ip challenge with peanut or lupine (Table 3). The peanut challenge produced clinical signs of allergic reaction (tremor, prostration) in peanut-sensitized C3H and to a lesser extent CBA mice. On the other hand, BALB/c and

Table 3
Hypersensitivity response in control and peanut-sensitized mice after ip challenge with peanut or lupine

Antigen	Strains	Scoring system
Peanut	C3H control	0
	C3H peanut-sensitized	5 (80%)
	CBA peanut-sensitized	4 (20%)
	BALB/c peanut-sensitized	0
	SJL peanut-sensitized	0
Lupine	C3H control	0
	C3H peanut-sensitized	0
	CBA peanut-sensitized	0
	BALB/c peanut-sensitized	0
	SJL peanut-sensitized	0

SJL mice did not show any clinical sign of allergy. Interestingly, none of the mouse strains showed signs of allergic reaction after ip challenge with lupine. No anaphylactic reaction was observed following peanut and lupine injection in mice immunized orally.

4. Discussion

It is now accepted that a number of parameters including the genetic background, the general immune status and the mode of sensitization contribute to food allergies. However, appropriate murine models are greatly needed to improve our understanding of mechanisms underlying these adverse immune reactions in humans. Recent studies have shown that susceptibility of mouse strains to peanut allergy was linked to differential T helper cell responses in different genetic backgrounds [19]. Cross-reactivity of peanut-specific antibody (Ab) with other legumes is frequently demonstrated but it still remains to be demonstrated whether these responses could lead to clinical signs of cross-allergenicity. Here we show that C3H, BALB/c, and CBA develop high levels of peanut-specific serum IgE, IgG1 Ab responses following intraperitoneal sensitization with peanut and alum as adjuvant. In addition, cross-allergenicity may not directly correlate with the presence of cross-reactive Abs since mice sensitized to peanut reacted with lupine in ELISA but failed to exhibit clinical symptoms of cross-allergenicity after challenge with lupine.

The most common immune response to ingested antigens is tolerance or systemic unresponsiveness. In order to overcome this tendency of orally administered antigens to generate tolerance, animal models of food allergies are being developed by oral co-administration of cholera toxin, a potent mucosal adjuvant that has been shown to enhance Th2-type response with IL-4 and IgE Abs in some mouse strains [21,22]. In this regard, intragastric gavage of mice with peanut protein and cholera toxin as adjuvant was shown to generate peanut-specific serum IgE Abs and hypersensitivity [18]. Other studies have shown that feeding a protein antigen as a constituent of the diet in a natural way without adjuvant can induce Th2-like response with high levels of systemic IgE in mouse [23] and rat strains (BN rats) [24]. We have shown that a weekly oral dose of peanut protein as part of the normal diet do not promote peanut IgE-specific Abs in C3H, CBA and SJL mice. The weekly oral peanut dose only induced IgG2a Abs and failed to set the stage for systemic anaphylactic symptoms. Our findings confirm the immunogenicity of peanut proteins. They also suggest that, in contrast with oral sensitization with peanut and CT as adjuvant which was shown to promote different T helper cell responses in C3H/HeJ and BALB/c mice [19], peanut proteins given without adjuvant as a constituent of the diet, peanut proteins could promote Th1-type responses in all three mouse strains. However, more studies will be needed to clearly demonstrate the exact pattern of Th cell cytokine responses promoted by oral sensitization with peanut alone.

In contrast with oral sensitization in the absence of adjuvant, the mice strains exhibited different responses after intraperitoneal sensitization. Thus, all the four strains developed peanut-specifc IgG whereas only three strains (C3H, CBA, BALB/c) presented peanut-specific IgE Abs. In addition, only two out of the three strains that developed IgE (C3H, CBA) exhibited symptoms of allergy upon peanut challenge. In our studies, anaphylactic reactions were seen after peanut challenge of C3H (H-2^k) and CBA (H-2^k) mice but not in BALB/c (H-2^d) or SJL (H-2^s) mice. Anaphylactic responses were reported after peanut challenge of C3H (H-2^k) but not AKR (H-2^k) or BALB/c (H-2^d) mice previously sensitized by administration of a plasmid DNA encoding peanut [4]. Therefore, while a number of parameters influence the immune responses, the H-2^k phenotype appears to contribute to the development of allergic-type immune responses such as those seen in C3H mice.

It is now established that IgE Abs play an important role for type 1 hypersensitivity in human [25,26] and animal [27,28]. Other murine studies suggest that immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness could be passively transferred by allergen-specific IgE and IgG1, but not IgG2a or IgG3 [18,29]. These studies are consistent with our finding that C3H and CBA mice which presented peanut-specific IgE and IgG1 Abs were the only strains that developed anaphylactic reactions upon peanut challenge. They are also consistent with the lack of anaphylactic reactions seen in SJL mice which exhibited peanut-specific IgG1 and IgG2a but not

IgE Abs. Interestingly, peanut-sensitized BALB/c mice produced peanut-specific IgE and IgG1 Abs but failed to develop clinical sign of allergy after peanut challenge. Thus, the induction of allergen-specific IgE and IgG1 Abs may not always lead to anaphylactic reactions in mouse models.

Antibody cross-reactivity generally reflects the phylogenetic relations that lead to proteins with high degree of primary structure homologies [30]. On the other hand, cross-allergenicity refers to allergic reactions elicited by antigen challenge after sensitization with a different antigen. Peanut-specific IgE Abs were shown to cross-react with homologous proteins in soybean and other legumes [30]. Nonetheless, only rare cases of cross-allergy between legumes have been reported [17]. In the present study, C3H, CBA and BALB/c mice sensitized to peanut contained IgE Abs which cross-reacted with lupine in vitro. The levels of cross-reactive IgE Abs were lower than those of peanut-specific IgE. More importantly, none of the mouse strain with peanut-specific IgE Abs showed signs of anaphylactic reaction after lupine challenge indicating that cross-allergic reaction did not occur.

In conclusion, several parameters including mice strains, the route of sensitization, the nature and dose of the antigens and the adjuvants should be considered in mouse models of food allergy. Our studies indicate that C3H mice represent a valuable model of peanut allergy capable of developing peanut-specific IgE and IgG1 Abs and anaphylactic responses upon peanut challenge. We also provided evidence suggesting that in vitro cross-reactivity of IgE and IgG1 Abs from peanut-sensitized mice with lupine flour may not translate into anaphylactic symptoms when mice are challenged with lupine. Taken together, our studies also confirm that appropriate animal models are needed in order to better delineate the mechanisms underlying primary food allergies and cross-allergenic reactions.

References

[1] Bakakos P, Smith JL, Warner JO, Vance G, Moss CT, Hodges E, et al. Modification of T-cell receptor V beta repertoire in response to allergen stimulation in peanut allergy. J Allergy Clin Immunol 2001;107(6):1089–94.

[2] Moneret-Vautrin DA, Rance F, Kanny G, Olsewski A, Gueant JL, Dutau G, et al. Food allergy to peanuts in France—evaluation of 142 observations. Clin Exp Allergy 1998;28:1113–9.

[3] Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, Warner JO. Clinical characteristics of peanut allergy. Clin Exp Allergy 1997;27:634–9.

[4] Li X, Huang CK, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Kim KH, et al. Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. J Immunol 1999;162:3045–52.

[5] Khakoo GA, Lack G. Preventing food allergy. Curr Allergy Asthma Rep 2004;4:36–42.

[6] Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. J Allergy Clin Immunol 1999;103:559–62.

[7] Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. N Engl J Med 1992;327:380–4.

[8] Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. J Allergy Clin Immuno l997;99:744–51.

[9] Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks Jr AW, Schneider LC, Wortel CH, et al. Avon longitudinal study of parents and children study team. Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. N Engl J Med 2003;348:986–93.

[10] Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. J Clin Invest 1997;99:901–14.

[11] Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, Chaplin DD. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. J Clin Invest 1999;104:1021–9.

[12] Barnett D, Bonham B, Howden ME. Allergenic cross-reactions among legume foods—an in vitro study. J Allergy Clin Immunol 1987;79:433–8.

[13] Bernhisel-Broadbent J, Taylor S, Sampson HA. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity: II. Laboratory correlates. J Allergy Clin Immunol 1989;84:701–9.

[14] Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity: II. Laboratory correlates. J Allergy Clin Immunol 1989;83:435–40.

[15] Sampson HA, McCaskill C. Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. J Pediatr 1985;107:669–75.

[16] Kanny G, Guerin L, Moneret-Vautrin DA. Risk of serious acute asthma due to lupine flour associated with peanut allergy. Rev Med Interne 2000;21:191–4.

[17] Moneret-Vautrin DA, Guerin L, Kanny G, Flabbee J, Fremont S, Morisset M. Cross-allergenicity of peanut and lupine: the

risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. J Allergy Clin Immunol 1999;104:883–8.
[18] Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. J Allergy Clin Immunol 2000;106:150–8.
[19] Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2–TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1122–8.
[20] Moutete HF, Olszewski A, Gastin I, Namour F, Moneret-Vautrin DA, Guent JL. Purification of allergenic proteins from peanut for preparation of the reactive solid phase of a specific IgE radioimmunoassay. J Chromatogr 1995;664:211–7.
[21] Marinaro M, Staats HF, Hiroi T, Jackson RJ, Coste M, Boyaka PN, et al. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. J Immunol 1995;155:4621–9.
[22] Snider DP, Marshall JS, Perdue MH, Liang H. Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. J Immunol 1994;153:647–57.
[23] Ito K, Inagaki-Ohara K, Murosaki S, Nishimura H, Shimokata T, Torii S, et al. Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. Eur J Immunol 1997;27:3427–37.
[24] Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. Toxicology 2001;167:217–31.
[25] Martin TR, Galli SJ, Katona IM, Drazen JM. Role of mast cells in anaphylaxis. Evidence for the importance of mast cells in the cardiopulmonary alterations and death induced by anti-IgE in mice. J Clin Invest 1989;83:1375–83.
[26] Ishizaka T, Tomioka H, Ishizaka K. Degranulation of human basophil leukocytes by anti-gamma E antibody. J Immunol 1971;106:705–10.
[27] Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet JP. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. Cell 1993;75:969–76.
[28] Naito K, Hirama M, Okumura K, Ra C. Recombinant soluble form of the human high-affinity receptor for IgE prevents anaphylactic shock in mice. J Allergy Clin Immunol 1996;97:773–80.
[29] Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, Bradley KL, Loader JE, Larsen GL, et al. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. J Clin Invest 1996;97:1398–408.
[30] Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy 2001;56:478–90.