



Development of a cell-based assay of the elicitation of the allergic reaction. Assessment of the allergenicity of milk and peanut proteins and of the effects of heat treatments on the allergenicity of Ara h 1.

Fany Blanc

► To cite this version:

Fany Blanc. Development of a cell-based assay of the elicitation of the allergic reaction. Assessment of the allergenicity of milk and peanut proteins and of the effects of heat treatments on the allergenicity of Ara h 1.. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0078 . pastel-00004944

HAL Id: pastel-00004944

<https://pastel.hal.science/pastel-00004944>

Submitted on 26 Mar 2009

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.

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Biologie

*présentée et soutenue publiquement
par*

Fany BLANC

27 novembre 2008

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE CELLULAIRE DE DECLenchement DE LA REACTION ALLERGIQUE. APPLICATIONS A L'ETUDE DES ALLERGENES DU LAIT ET DE L'ARACHIDE, ET EVALUATION DE L'EFFET DE TRAITEMENTS THERMIQUES SUR L'ALLERGENICITE DE Ara h 1.

*Directeur de thèse : **Jean-Michel WAL***

*Travail réalisé à l'INRA, UR 0496 Unité d'Immuno-Allergie Alimentaire,
F-91191 Gif-sur-Yvette*

Devant le jury :

Mme Catherine LAPIERRE, Professeur, INRA-AgroParis Tech.....	Présidente
M. Michel AROCK, Professeur, ENS Cachan	Rapporteur
M. Pierre SCHEINMANN, Professeur, Hôpital Necker Enfants Malades.....	Rapporteur
M. René CREVEL, Docteur, UNILEVER.....	Examinateur
Mme Karine ADEL-PATIENT, Docteur, INRA	Examinateur
M. Jean-Michel WAL, Docteur, INRA	Directeur de thèse

**Développement d'un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique.
Applications à l'étude des allergènes du lait et de l'arachide et évaluation de l'effet de
traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h 1.**

Les allergies alimentaires à l'arachide et au lait posent un problème majeur de santé publique, en particulier chez les enfants. Nous avons développé un modèle cellulaire de dégranulation, afin d'analyser si la liaison d'un allergène à ses IgE spécifiques, mesurée *in vitro*, a bien la capacité de déclencher la phase effectrice de la réaction allergique. Ce modèle repose sur l'utilisation de la lignée cellulaire RBL SX-38 développée par JP Kinet, mastocytes de rat immortalisés et modifiés pour exprimer le récepteur de haute affinité aux IgE humaines.

Le développement de ce modèle pour son utilisation en microplaques de 96 puits a consisté notamment en l'optimisation de différents paramètres critiques pour la réalisation des 2 phases du test : la phase de sensibilisation des cellules par les IgE de patients allergiques et la phase de déclenchement par les allergènes auxquels le patient est sensibilisé. Ce modèle a permis de montrer l'importance des caséines et des albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6) dans cette étape clé de la réaction allergique au lait et à l'arachide, confirmant les observations sérologiques et cliniques disponibles.

L'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité d'un allergène majeur de l'arachide (Ara h 1), a été évalué dans le cadre du programme européen EuroPrevall. Les résultats obtenus montrent la diminution de la réactivité d'Ara h 1 après chauffage de la protéine isolée en solution. Par contre, la même protéine préparée et purifiée à partir d'arachide grillée présente une forte réactivité. Ces résultats suggèrent qu'un traitement à température élevée de la graine entraîne une augmentation de l'allergénicité de Ara h 1 du fait de ses interactions avec les autres constituants de la graine.

Le modèle cellulaire de dégranulation développé apparaît être un outil pertinent pour l'étude de la fonctionnalité biologique de l'interaction allergène-IgE, permettant une meilleure compréhension de la relation entre la structure d'une protéine alimentaire et son allergénicité, voire une évaluation du risque allergique des aliments ne nécessitant pas d'essais cliniques systématiques.

Mots-clés : IgE, mastocytes, dégranulation, arachide, lait, allergènes, caséines, albumine 2S, Ara h 1

**Development of a cell-based assay of the elicitation of the allergic reaction.
Assessment of the allergenicity of milk and peanut proteins and of the
effects of heat treatments on the allergenicity of Ara h 1.**

IgE-mediated food allergies to peanut and milk represent a major health issue particularly in children. Cross linking of specific IgE bound on basophils and mast cells by the allergen is a critical step for the elicitation of an allergic reaction. A cell-based assay has been developed to analyse the capacity of an allergen to induce the mediator release by those cells when interacting with IgE bound on their membrane. The assay uses cell line RBL SX-38 developed by JP Kinet derived from rat mast cells engineered to express the human high affinity receptor for IgE. The development of the assay in a 96-well format has required the optimization of various parameters involved in both the cell sensitization step using IgE from peanut allergic patients and the cell activation step by the corresponding allergen. This test has confirmed the degranulation potential of all milk and peanut proteins, and in particular of milk casein and peanut 2S albumins, Ara h 2 and Ara h 6, corroborating the available clinical observations.

In the frame of the European program EuroPrevall, we have evaluated the impact of thermal treatments on allergenicity of Ara h 1. Our results have shown that allergenicity of Ara h 1 is decreased when the purified protein is heated in solution, but is increased during roasting of peanut because of interactions between Ara h 1 and food matrix constituents.

This cell-based test thus demonstrated to be a relevant tool to study the biological consequences of the interactions between allergens and IgE. It makes possible to better understand the relationship between the structure of a food protein and its allergenicity and, hopefully, to assess the allergenicity of new foods without requiring provocation tests on patients.

Key words: IgE, mast cell, degranulation, peanut, milk, allergens, caseins, 2S albumins, Ara h 1

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans l'Unité INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA), implantée au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) / Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse (LERI) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Saclay. Elle a été co-financée par le programme européen EuroPrevall et le département Alimentation Humaine de l'INRA.

Mes premiers remerciements vont au Dr Jean-Michel Wal, Directeur de l'UIAA et Directeur de cette thèse, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour la gentillesse qu'il a témoignée à mon égard, pour ses corrections de mes publications, et pour tous ces bons moments passés en congrès.

Je remercie le Dr Christophe Créminon, chef de service du SPI, pour son accueil au sein du service, mais aussi pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et les remarques constructives qu'il a pu me faire.

Je remercie très chaleureusement les Drs Karine Adel-Patient et Hervé Bernard pour m'avoir si bien encadrée, leur aide dans mon apprentissage de toutes ces techniques, leur intérêt pour mes travaux, leurs corrections de ce manuscrit et de mes différentes publications, leur disponibilité, leur gentillesse, leur patience, ... En bref, un grand, un énorme, un immense merci !

Je remercie par ailleurs les différents membres du jury, en premier lieu, le Pr Catherine Lapierre pour avoir présidé ce jury, les Prs Pierre Scheinmann et Michel Arock, rapporteurs de cette thèse, qui me font l'honneur de juger mon travail, et le Dr René Crevel. Je les remercie pour leur participation à ce jury.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, les Drs Evelyne Paty, Michel Laurière, Marie Bodinier et Sandra Denery, qui ont pris de leur temps pour m'apporter des éclairages précieux quant à ce travail.

Je remercie également tous les acteurs du programme EuroPrevall, cliniciens et scientifiques, en particulier ceux impliqués dans le WP3.3.3 pour leur engagement dans ce travail, les agréables présentations et discussions au cours des réunions du programme.

Je tiens à remercier les autres membres de l'UIAA, et en premier lieu Marie-Françoise, merci pour ta patience, pour m'avoir lancée sur le chemin de la culture cellulaire et de la plaque, pour tous les coups de mains (y compris de dernière minute). J'ai apprécié nos discussions scientifiques et celles un peu moins scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette thèse tant au niveau pratique que psychologique. Je remercie tous les autres membres de cette équipe : les deux Stéphane, Jean-Marc, Romy, Sandrine, Laetitia, Valéria, Blanche, Gilles, Marja-Liisa et Narimane. Merci pour la science évidemment, mais aussi pour l'ambiance chaleureuse qui règne dans cette équipe et ces tournois inter-labos auxquels nous avons participé (oui, l'important, c'est de participer...).

Mes sincères remerciements vont à tous les habitants du 2^{ème} étage du SPI, cet étage si particulier où il fait bon travailler. Etre à vos côtés pendant ces trois années a contribué à mon bonheur ! Un merci particulier au chef du LERI : Hervé ; à mes collègues de bureau, de paillasse et de salle de culture : ceux déjà cités et Juju, Boubou, Maud, Nanou, Stéphanie, Nathalie, Geoffrey ; à Marie-Claire (j'ai grandement apprécié tes petites attentions, j'en profite pour te remercier ici) ; au trio infernal toujours prêt à dépanner : Patou, Karinette et Marcus ; à Jean-Yves, Sylvain, Cécile, Loïc et tous ceux qui sont passés par le SPI. Merci à vous tous pour ces bons moments passés, parfois autour d'une bière.

Merci également à tous les membres du SPI, en particulier aux thésards, les « déjà » docteurs : Coralie, Laurence et Alexandra et les « futurs » docteurs : Matthieu, Erwan, Elodie et Julie. J'adresse ici un remerciement spécial à Nathalie, ma thésarde préférée et amie.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis qui m'ont soutenue durant ces trois années et bien avant encore... Et, pour finir, merci à toi David.

ABBREVIATIONS

A : Absorbance
AChE : AcétylCholinEstérase
AIF : Adjuvant Incomplet de Freund
 α -lac : alpha-lactalbumine
Ara h 1 - N : Ara h 1 Native, issue d'arachide crue
Ara h 1 - C : Ara h 1 Chauffée en solution
Ara h 1 - CG : Ara h 1 Chauffée en solution en présence de Glucose
Ara h 1 grillée : Ara h 1 issue d'arachide grillée
 β LG : β -lactoglobuline
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
DBPCFC : Double Blind, Placebo-Controlled Food Challenge
EAST : Enzyme Allergo-Sorbent Test
EC50 : Concentration activatrice 50%
EIA : Enzyme ImmunoAssay
ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EPBA : Extrait Protéique Brut d'Arachide
Fc ϵ RI : récepteur de haute affinité pour les IgE
Fc ϵ RII : récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23)
Fc γ R : récepteur pour les IgG
G4 : forme tétramérique de l'AChE
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
IC50 : Concentration Inhibitrice 50%
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
i.g. : intra-gastrique
i.n. : intra-nasal
i.p. : intra-péritonéal
i.t. : intra-trachéal
IL : Interleukine
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LT : Leucotriène
MaxD : Maximum de Dégranulation
MM : Masse Molaire
NK (cellules) : Natural Killers, tueuses naturelles
nsLTP : Protéine de Transfert des Lipides non spécifique
PBS : Phosphate Buffer Saline
PGD : Prostaglandine
RBL : Rat Basophilic Leukaemia
SAB : Sérum Albumine Bovine
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide en présence de SDS
SPT : Skin Prick Test
SVF : Sérum de Veau Fœtal
Th : Cellule T auxiliaire (T helper)
TNF : Tumor Necrosis Factor
TPO : Test de Provocation Orale
Treg : Cellule T régulatrice

UE : Unité Ellman
UI : Unité Internationale

INTRODUCTION GENERALE.....19

I. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE19

I.1. L'allergie alimentaire : définitions, prévalence et symptômes..... 20

I.1.1.	Définitions et classifications.....	20
I.1.2.	Prévalence de l'allergie alimentaire.....	23
I.1.3.	Symptômes cliniques	24
I.1.4.	Facteurs influençant la survenue d'une réaction allergique alimentaire	26
I.1.4.1.	Facteurs génétiques	26
I.1.4.2.	Facteurs environnementaux et hypothèse hygiéniste.....	27
I.1.4.3.	Autres facteurs	28

I.2. Acteurs et mécanisme de l'allergie alimentaire de type I..... 29

I.2.1.	Les acteurs de l'allergie alimentaire	29
I.2.1.1.	Les IgE et les récepteurs aux IgE.....	29
I.2.1.1.a.	<i>Les IgE</i>	29
I.2.1.1.b.	<i>Le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI)</i>	31
I.2.1.1.c.	<i>La liaison de l'IgE au FcεRI</i>	33
I.2.1.1.d.	<i>Régulation de l'expression du FcεRI</i>	33
I.2.1.1.e.	<i>Le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII ou CD23)</i>	34
I.2.1.2.	Les cellules effectrices de l'allergie.....	34
I.2.1.2.a.	<i>Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)</i>	34
I.2.1.2.b.	<i>Les lymphocytes T auxiliaires et T régulateurs</i>	35
I.2.1.2.c.	<i>Les lymphocytes B</i>	38
I.2.1.2.d.	<i>Les granulocytes</i>	38
I.2.1.2.d.i.	<i>Basophiles</i>	38
I.2.1.2.d.ii.	<i>Mastocytes</i>	38
I.2.1.2.d.iii.	<i>Eosinophiles</i>	39
I.2.2.	Le mécanisme de l'allergie alimentaire	40
I.2.2.1.	Franchissement de la barrière mucoale	40
I.2.2.2.	Phase de sensibilisation.....	41
I.2.2.3.	Phase de déclenchement.....	43
I.2.2.3.a.	<i>Pontage des IgE et dégranulation des cellules effectrices</i>	43
I.2.2.3.b.	<i>Phase précoce</i>	44
I.2.2.3.c.	<i>Phase tardive</i>	45

I.3. Les allergènes alimentaires..... 46

I.3.1.	Principaux allergènes alimentaires	46
I.3.2.	L'allergie à l'arachide	48
I.3.2.1.	Prévalence et caractéristiques cliniques.....	48
I.3.2.1.a.	<i>Prévalence et histoire naturelle</i>	48
I.3.2.1.b.	<i>Tableau clinique</i>	49
I.3.2.1.c.	<i>Dose réactogène</i>	50
I.3.2.1.d.	<i>Allergies croisées</i>	51
I.3.2.2.	Les allergènes de l'arachide	51

1.3.2.2.a. Les protéines d'arachide	51
1.3.2.2.b. Les allergènes identifiés de l'arachide.....	52
I.3.3. L'allergie au lait de vache	55
I.3.3.1. Prévalence et caractéristiques cliniques.....	56
1.3.3.1.a. Prévalence et histoire naturelle	56
1.3.3.1.b. Tableau clinique	56
1.3.3.1.c. Dose réactogène	57
1.3.3.1.d. Réactions croisées	57
I.3.3.2. Les allergènes du lait de vache	58
1.3.3.2.a. Les protéines du lait de vache	58
1.3.3.2.b. Les allergènes identifiés dans le lait de vache	60
I.3.4. L'allergie à la noisette	61
I.3.4.1. Prévalence et caractéristiques cliniques.....	61
1.3.4.1.a. Prévalence	61
1.3.4.1.b. Tableau clinique	62
I.3.4.2. Les allergènes de la noisette.....	62
I.3.5. Conclusion	64

II. ETUDE *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE L'ALLERGENICITE DES ALIMENTS65

II.1. Outils d'évaluation de l'allergénicité.....	65
II.1.1. Tests <i>in vitro</i> de la réactivité des IgE	66
II.1.1.1. Etude de la liaison IgE-allergène	66
II.1.1.1.a. Immunoempreinte	66
II.1.1.1.b. Dosage des IgE spécifiques.....	66
II.1.1.2. Etude sur cellules effectrices.....	68
II.1.2. Modèles animaux.....	69
II.1.2.1. Evaluation du pouvoir sensibilisant.....	69
II.1.2.2. Evaluation du pouvoir déclenchant.....	70
II.1.3. Tests de provocation chez l'homme	72
II.1.3.1. Tests cutanés	72
II.1.3.2. Test de provocation orale.....	73
II.2. Effet des traitements sur l'allergénicité des aliments	74
II.2.1. Digestion.....	75
II.2.1.1. Effet de la digestion sur l'allergénicité des allergènes vrais.....	76
II.2.1.2. Effet de la digestion sur l'allergénicité des allergènes incomplets	78
II.2.2. Traitements thermiques	80
II.2.2.1. Effet du chauffage sur les allergènes purifiés	81
II.2.2.2. Effet de la génération de produits de la réaction de Maillard au cours du chauffage.....	82
II.2.2.3. Effet du chauffage sur l'aliment entier	82
II.2.2.4. Impact sur la digestibilité.....	84
II.2.3. Autres procédés industriels.....	84
II.2.3.1. Diminution du potentiel allergénique	84
II.2.3.2. Conservation/protection du potentiel allergénique	85

II.2.3.3. Augmentation du potentiel allergénique et/ou formation de néoallergènes.....	85
II.2.4. Matrice alimentaire.....	86

III.CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE88

PREMIERE PARTIE : DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION D'UN MODELE CELLULAIRE DE DECLenchement DE LA REACTION ALLERGIQUE91
--

I. INTRODUCTION.....92

I.1. La lignée cellulaire d'origine : RBL 2H3.....	92
I.2. Humanisation des cellules RBL 2H3	92
I.3. La lignée cellulaire RBL SX-38.....	93

II. MATERIELS ET METHODES95

II.1. Purifications des allergènes des laits de vache et de chèvre et de l'arachide....	95
II.1.1. Purification des allergènes des laits de vache et de chèvre	95
II.1.2. Purification des allergènes de l'arachide	98
II.2. Sérums de patients allergiques.....	99
II.2.1. Sérums de patients allergiques à l'arachide.....	100
II.2.2. Sérums de patients allergiques au lait.....	101
II.3. Dosages enzymo-immunologiques des IgE totales et des IgE spécifiques et dosage des complexes IgE-IgG présents dans les sérums.....	102
II.3.1. Matériels et tampons utilisés	102
II.3.1.1. Matériels d'immunoanalyse utilisés	102
II.3.1.2. Tampons utilisés	103
II.3.2. Préparation des plaques de microtitration avec l'anticorps ou l'antigène immobilisé	103
II.3.3. Préparation des traceurs.....	104
II.3.4. Dosages enzymo-immunologiques des anticorps présents dans les sérums...	104
II.3.4.1. Dosage des IgE totales	104
II.3.4.2. Détection des IgE spécifiques	105
II.3.4.2.a. Dosage par immobilisation de l'allergène.....	105
II.3.4.2.b. Détection par capture d'IgE.....	105
II.3.4.3. Dosage des complexes IgE-IgG.....	106
II.4. Modèle cellulaire	106

II.4.1.	Conditions de culture des cellules RBL SX-38 et RBL 2H3	106
II.4.1.1.	Milieu de culture	106
II.4.1.2.	Repiquage des cellules	107
II.4.1.3.	Numération et détermination de la viabilité cellulaire.....	107
II.4.1.4.	Congélation/décongélation	107
II.4.1.5.	Sous-clonage par dilutions limites	108
II.4.2.	Expression du récepteur aux IgE humaines par les cellules RBL SX-38.....	108
II.4.2.1.	Contrôle de l'expression de la chaîne α du Fc ϵ RI humain par cytométrie en flux	108
II.4.2.2.	Contrôle de l'expression de la chaîne β du Fc ϵ RI humain	109
II.4.3.	Test de dégranulation.....	111
II.4.3.1.	Ensemencement des cellules	111
II.4.3.2.	Sensibilisation passive des cellules.....	112
II.4.3.3.	Activation des cellules	113
II.4.3.4.	Dosage des médiateurs libérés	114
II.4.3.5.	Contrôles réalisés lors des tests de dégranulation.....	115
II.4.3.6.	Expression des résultats	115

III.RESULTATS ET DISCUSSION.....117

III.1. Mise au point du modèle cellulaire de dégranulation avec les cellules RBL SX-38 117

III.1.1.	Choix du médiateur dosé pour évaluer la dégranulation des cellules.....	117
III.1.2.	Sous-clonage de la lignée et sélection du meilleur clone	119
III.1.2.1.	Expression de la chaîne α du Fc ϵ RI par les différents clones	120
III.1.2.2.	Evaluation de la capacité de dégranulation des différents clones	121
III.1.2.3.	Caractérisation du clone sélectionné.....	122
III.1.3.	Adaptation du test cellulaire de dégranulation au format 96 puits	124
III.1.4.	Optimisation de l'étape de sensibilisation	125
III.1.4.1.	Amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité du test par prétraitement des sérums humains	125
III.1.4.2.	Optimisation de la quantité d'IgE	129
III.1.4.3.	Optimisation du volume de milieu dans lequel sont diluées les IgE	130
III.1.4.4.	Durée d'incubation des IgE avec les cellules.....	130
III.1.5.	Optimisation de l'étape d'activation.....	131
III.1.5.1.	Durée d'incubation avec les activateurs.....	131
III.1.5.2.	Dégranulation de référence	131
III.1.6.	Bilan des conditions expérimentales optimales pour le test cellulaire de dégranulation	133
III.1.7.	Discussion sur la mise au point du modèle cellulaire de dégranulation	135

III.2. Applications du modèle cellulaire..... 138

III.2.1.	Etude des allergènes du lait	138
III.2.1.1.	Confirmation de la fonctionnalité des allergènes purifiés	138
III.2.1.2.	Comparaison du potentiel de dégranulation des allergènes purifiés des laits de vache et de chèvre.....	142
III.2.1.2.a.	Caractéristiques des sérums utilisés	142

III.2.1.2.b. Profil des courbes de dégranulation induites par les différents allergènes des laits de vache et de chèvre.....	144
III.2.1.2.c. Analyse des intensités des dégranulations obtenues : correspondance avec l'intensité de la réponse IgE spécifique	147
III.2.1.2.d. Doses d'allergènes induisant les dégranulations.....	149
III.2.1.2.e. Conclusions et discussion.....	151
III.2.2. Etude des allergènes purifiés de l'arachide	154
III.2.2.1. Comparaison du potentiel de dégranulation de différents allergènes purifiés de l'arachide.....	154
III.2.2.1.a. Caractéristiques des sérums utilisés	154
III.2.2.1.b. Profils des courbes de dégranulation.....	156
III.2.2.1.c. Intensités des dégranulations	159
III.2.2.1.d. Doses d'allergènes induisant les dégranulations.....	162
III.2.2.2. Liens entre capacité à dégranuler et caractéristiques immunochimiques des sérums et cliniques des patients.....	164
III.2.2.2.a. Pourcentages en IgE spécifiques vs IgE totales des sérums et intensités de dégranulation	164
III.2.2.2.b. Existe-t-il un lien entre la capacité des sérums à dégranuler les cellules et la symptomatologie du patient ?	167
III.2.2.2.c. Les complexes IgE-IgG présents dans les sérums ont-ils une influence sur le test de dégranulation ?	168
III.2.2.3. Conclusions.....	174

IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE177

SECONDE PARTIE : EFFET DE TRAITEMENTS THERMIQUES SUR L'ALLERGENICITE DE LA GLOBULINE 7S DE L'ARACHIDE (Ara h 1).....181
--

I. INTRODUCTION.....181

II. MATERIELS ET METHODES183

II.1. Purifications et modifications des allergènes..... 183

II.2. Données cliniques des patients allergiques recrutés et caractérisations immunologiques de leurs sérums..... 183

II.3. Etude de la capacité de liaison des allergènes naturels/modifiés aux IgE de patients allergiques..... 188

II.3.1. Dosage des IgE spécifiques humaines..... 188

II.3.1.1. Dosage des IgE spécifiques par EAST 188

II.3.1.2. Détection des IgE spécifiques par capture des IgE..... 189

II.3.2. Etude de la capacité de liaison des allergènes aux IgE de patients allergiques..... 189

II.4. Etude <i>in vitro</i> du potentiel de déclenchement des allergènes naturels ou modifiés à l'aide des IgE humaines.....	190
II.5. Etude <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> du potentiel de déclenchement des allergènes naturels/modifiés chez la souris BALB/c.....	190
II.5.1. Souris	192
II.5.2. Sensibilisation expérimentale	192
II.5.2.1. Immunisation en AIF	192
II.5.2.2. Immunisation en alum.....	192
II.5.3. Confirmation de la sensibilisation	193
II.5.3.1. Dosage enzymo-immunologiques des IgE, IgG1 et IgG2a totales et spécifiques de Ara h 1 - N.....	193
II.5.3.2. Dosage des cytokines Th1/Th2 sécrétées par les splénocytes des souris immunisées	194
II.5.3.2.a. Mise en culture et réactivation des splénocytes	194
II.5.3.2.b. Dosage des cytokines Th1/Th2	195
II.5.4. Etude de la capacité de liaison des allergènes naturels/modifiés aux IgE de souris sensibilisées expérimentalement	195
II.5.5. Etude <i>in vitro</i> du potentiel de déclenchement des allergènes naturels ou modifiés à l'aide des IgE de souris sensibilisées expérimentalement	196
II.5.6. Test de déclenchement <i>in vivo</i> chez la souris sensibilisée expérimentalement.....	197
II.5.6.1. Mesure des paramètres de la réaction allergique immédiate	197
II.5.6.1.a. Test de provocation et prélèvement des LBA	198
II.5.6.1.b. Dosages des leucotriènes et des prostaglandines dans les LBA	198
II.5.6.2. Mesure des paramètres de la réaction tardive	199
II.5.6.2.a. Test de provocation et prélèvement des LBA	199
II.5.6.2.b. Analyse de l'influx cellulaire dans les LBA.....	199
II.5.6.2.c. Dosage des cytokines Th1/Th2 dans les LBA.....	200
II.5.7. Analyses statistiques.....	200

III.RESULTATS ET DISCUSSION.....201

III.1. Analyse des profils de sensibilisation aux albumines 7S de l'arachide, de la noisette, du soja et du pois chez les patients allergiques.....	201
III.1.1. Dosages des IgE spécifiques de la globuline 7S du pois et du soja dans les sérums de patients allergiques	201
III.1.2. Profils de sensibilisation aux allergènes de noisette selon l'origine géographique des patients.....	201
III.1.3. Sensibilisation des patients allergiques à l'arachide.....	203
III.1.4. Conclusions et nouveaux objectifs	205
III.2. Effets des traitements thermiques sur l'allergénicité de la globuline 7S de l'arachide (Ara h 1)	206
III.2.1. Evaluation de l'effet de traitements thermiques sur la capacité de liaison aux IgE de patients allergiques à l'arachide	207
III.2.1.1. Analyse des IgE spécifiques par dosage EAST	207

III.2.1.2. Analyse par test d'inhibition en capture d'IgE	208
III.2.1.2.a. Détection des IgE spécifiques de Ara h 1 - N en capture d'IgE.....	208
III.2.1.2.b. Tests de compétitions de Ara h 1 - N vs Ara h 1 - C et - CG en capture d'IgE.....	209
III.2.2. Effet des traitements thermiques sur la capacité de dégranulation de cellules effectrices sensibilisées par les IgE de patients allergiques	211
III.2.3. Effet des traitements thermiques sur le potentiel de déclenchement de la réaction allergique chez des souris sensibilisées expérimentalement	214
III.2.3.1. Evaluation de la sensibilisation des souris.....	214
III.2.3.1.a. Dosages des IgE, IgG1 et IgG2a induites	214
III.2.3.1.b. Dosages des cytokines Th1/Th2 sécrétées ex vivo.....	216
III.2.3.2. Etude de la capacité de liaison des IgE spécifiques induites à Ara h 1 naturelle et modifiée.....	217
III.2.3.3. Tests de déclenchement <i>in vitro</i> à l'aide de sérums de souris sensibilisées expérimentalement	219
III.2.3.4. Induction du déclenchement de la réaction allergique <i>in vivo</i>	221
III.2.3.4.a. Analyse des marqueurs précoces de la réaction allergique.....	221
III.2.3.4.b. Analyse des marqueurs de la réaction tardive	222
III.2.3.5. Conclusions.....	226

IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSION228

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....231
--

BIBLIOGRAPHIE235

ANNEXES267

ANNEXE I : ARTICLE

“Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens”
Molecular Nutrition & Food Research, sous presse

ANNEXE II : ARTICLE

“Evaluation of purified peanut allergens to induce degranulation in a functional in vitro assay:
Ara h 2 and Ara h 6 are the most efficient elicitors”
Clinical and Experimental Allergy, soumis

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Algorithme détaillé des mécanismes des manifestations cliniques d'hypersensibilité	22
Figure 2 : Fréquence des allergies alimentaires selon l'âge et le sexe	24
Figure 3 : Représentation schématisée d'une immunoglobuline E	31
Figure 4 : Représentation schématisée du FcεRI.....	32
Figure 5 : Structure du complexe entre la partie Fcε3-4 de l'IgE et les domaines extracellulaires de la chaîne α du FcεRI.....	33
Figure 6 : Induction et régulation des cellules Th1/Th2/Th17 et T régulatrices.....	37
Figure 7 : Prise en charge des antigènes alimentaires présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale ...	41
Figure 8 : Mécanisme de l'allergie alimentaire immédiate IgE-dépendante	41
Figure 9 : Signalisation intracellulaire via le FcεRI aboutissant à la dégranulation des mastocytes et basophiles.	44
Figure 10 : Fréquence des allergies alimentaires à 10 catégories d'aliments chez l'enfant et chez l'adulte.....	47
Figure 11 : Electrophorèse bidimensionnelle de l'arachide et identification des protéines.....	52
Figure 12 : Etapes de la purification des allergènes du lait de vache.....	96
Figure 13 : Electrophorèse SDS-PAGE des allergènes du lait de vache (A) et de chèvre (B).....	97
Figure 14 : Etapes de l'extraction et de la purification des allergènes de l'arachide.	98
Figure 15 : Electrophorèse SDS-PAGE des allergènes de l'arachide.....	99
Figure 16 : Principe du test cellulaire de dégranulation.....	111
Figure 17 : Modélisation des résultats de dégranulation.....	116
Figure 18 : Comparaison de la libération d'histamine et de β-hexosaminidase par les cellules RBL SX-38.....	118
Figure 19 : Comparaison de la capacité de dégranulation des clones n°1 et n°38 et des cellules de la lignée-mère de RBL SX-38 sensibilisées par les IgE immunopurifiées des sérums n° 42, 263 et 392.....	122
Figure 20 : Contrôle de l'expression de la chaîne β par immunoempreinte après séparation par SDS-PAGE des extraits protéiques cellulaires	123
Figure 21 : Détermination du nombre de cellules optimales à ensemercer par puits pour le test de dégranulation.....	125
Figure 22 : Effets comparatifs des différents prétraitements du pool de sérums de patients allergiques à l'arachide sur la dégranulation induite par l'EPBA.	128
Figure 23 : Influence de la concentration en IgE immunopurifiées sur la dégranulation de référence des cellules RBL SX-38.	129
Figure 24 : Cinétique de l'étape de sensibilisation.	130
Figure 25 : Cinétique de la phase d'activation.....	131
Figure 26 : Dégranulations par différents anticorps anti-IgE humaines de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec les IgE du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide.	132
Figure 27 : Libération de β-hexosaminidase de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec le sérum BCB69 et activées par les allergènes purifiés du lait : α-lactalbumine, β-lactoglobuline et caséines bovines et caprines.	140

Figure 28 : Dégranulations des cellules RBL SX-38 sensibilisées par des IgE immunopurifiées du sérum BCB116 puis activées par les allergènes du lait de vache (A) et du lait de chèvre (B).	145
Figure 29 : Comparaison des valeurs d'EC50 obtenues après activation des cellules par la β LG, la fraction caséine entière et les différentes caséines (α s1, α s2, β et κ) des laits de vache et de chèvre.....	150
Figure 30 : Libération de β -hexosaminidase des cellules RBL SX-38 sensibilisées avec le sérum n° 445 et activées avec l'EPBA ou les différents allergènes purifiés de l'arachide.	157
Figure 31 : Dégranulation spécifique induite par Ara h 6 de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec les sérums n° 92 et 445.	157
Figure 32 : Corrélations entre la proportion d'IgE spécifiques / IgE totales et les maximum de dégranulation (MaxD) induits par l'EPBA et les différents allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 (1er et 2nd pic) et le fragment de Ara h 3.....	161
Figure 33 : Comparaison des valeurs d'EC50 obtenues après activation des cellules sensibilisées par les 12 sérums par l'EPBA, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 et le fragment de Ara h 3.	162
Figure 34 : Effet du pourcentage en IgE spécifiques vs IgE totales sur la dégranulation de cellules RBL SX-38 par l'EPBA par ajout dosé d'IgE non spécifiques de l'arachide à des IgE immunopurifiées du sérum n° 263.	165
Figure 35 : Paramètres des courbes de dégranulation obtenues pour l'EPBA (A : maximum de dégranulation, et B : EC50) selon la symptomatologie des patients.....	167
Figure 36 : Dosage des complexes IgE-IgG1, 2 et 3 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide.....	169
Figure 37 : Dosage des complexes IgE-IgG4 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide.	170
Figure 38 : Dosage des complexes IgE-IgG4 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide après immunopurification des IgE.	171
Figure 39 : Paramètres des courbes de dégranulation obtenues pour l'EPBA (A : maximum de dégranulation, et B : EC50) selon les taux de complexes IgE- (IgG4 anti-IgE) dans les sérums.....	173
Figure 40 : Principe de l'étude du déclenchement de la réaction allergique chez la souris BALB/c.	191
Figure 41 : Capacité de liaison aux IgE par EAST sur des plaques revêtues de Ara h 1 – N (naturelle), - C (chauffée) et - CG (chauffée en présence de glucose) ou de Ara h 1 grillée.....	207
Figure 42 : Détection des IgE spécifiques de Ara h 1 - N en capture d'IgE effectuée avec les sérums de patients allergiques à l'arachide dilués au 1/4, 1/20 et 1/100.	208
Figure 43 : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques au traceur Ara h 1 - N - G4, obtenues pour le pool de 76 sérums et 2 sérums individuels (56A et n°488) de patients allergiques à l'arachide.....	209
Figure 44 : Dégranulation de cellules RBL SX-38 sensibilisées par le sérum 2305 (A) et le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide (B), puis activées par les différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée).	212
Figure 45 : Dosage des IgE spécifiques de Ara h 1 - N des souris sensibilisées en AIF et en alum	215

Figure 46 : Dosage des IgG1 (A, sérums dilués au 1/100000) et IgG2a (B, sérums dilués au 1/1000) spécifiques de Ara h 1 - N des souris sensibilisées en AIF et en alum.....	215
Figure 47 : Dosage des cytokines Th1/Th2 dans les surnageants des splénocytes réactivés de souris sensibilisées par Ara h 1 - N an AIF ou en alum ou de souris naïves..	217
Figure 48 : IgE spécifiques de Ara h 1 - N, Ara h 1 - C et Ara h 1 - CG dans les sérums de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum évaluées par EAST .	218
Figure 49 : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE au traceur Ara h 1 - N - G4, obtenues pour les pools de sérums de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum.....	218
Figure 50 : Dégranulation de cellules RBL 2H3 sensibilisées par le pool de sérums de souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF (à gauche) et en alum (à droite), puis activées par les différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée).	219
Figure 51 : Production de leucotriènes LTC4 (A) et LTE4 (B) dans les LBA des souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum.....	222
Figure 52 : Production de cytokines 24 h après la provocation i.n. de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum ou chez des souris naïves	223
Figure 53 : Nombre de cellules totales, d'éosinophiles, de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages dans les LBA des souris sensibilisées avec Ara h 1 - N en AIF ou en alum et provoquées par l'Ara h 1 -N, - C, - CG ou une solution saline.....	225

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de Gell et Coombs	21
Tableau 2 : Principaux symptômes de l'allergie alimentaire	25
Tableau 3 : Caractéristiques des allergènes de l'arachide.....	53
Tableau 4 : Principales caractéristiques des protéines du lait de vache	58
Tableau 5 : Principales protéines allergènes de la noisette.	63
Tableau 6 : Caractéristiques de 12 patients allergiques à l'arachide	101
Tableau 7 : Caractéristiques des patients allergiques au lait.	101
Tableau 8 : Caractéristiques des clones de RBL SX-38.....	120
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les sérums utilisés après différents prétraitements.	127
Tableau 10 : Récapitulatif des conditions expérimentales pour réaliser le test de dégranulation cellulaire.	133
Tableau 11 : Caractéristiques sérologiques des sérums.	139
Tableau 12 : Dégranulation basale, dégranulation nette de référence obtenues selon les sérums, maximum de dégranulation (MaxD) et EC50 calculés pour les différents sérums et les différents allergènes purifiés du lait de vache et de chèvre.	141
Tableau 13 : Dosage des IgE totales et spécifiques des allergènes du lait de vache et de chèvre dans les sérums de patients allergiques au lait de vache et de chèvre, dans les sérums de patients allergiques au lait de chèvre tolérant le lait de vache (BCB26, BCB96) et dans le pool des sérums de patients allergiques à l'arachide (432/831, témoin négatif)	143
Tableau 14 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par les différents allergènes du lait de vache.....	146
Tableau 15 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par les différents allergènes du lait de chèvre.	146
Tableau 16 : Dosages des IgE totales et spécifiques des allergènes de l'arachide dans les sérums.....	155
Tableau 17 : Maximum de dégranulation (MaxD) et EC50 obtenus avec des cellules RBL SX-38 sensibilisées avec des IgE immunopurifiées de sérums humains de patients allergiques à l'arachide, et activées avec l'EPBA, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, et le fragment de Ara h 3.	159
Tableau 18: Caractéristiques cliniques des patients allergiques à l'arachide et +/- à la noisette recrutés en Grèce dans le cadre du programme EuroPrevall	184
Tableau 19 : Caractéristiques immunologiques des sérums de patients allergiques à l'arachide collectés en Suisse et aux Pays-Bas dans le cadre d'EuroPrevall, et données cliniques	185
Tableau 20 : Caractéristiques immunologiques des sérums de patients allergiques à la noisette collectés dans le cadre du programme EuroPrevall provenant de France, Espagne et Suisse, et données cliniques.	186
Tableau 21 : Caractéristiques cliniques des patients allergiques au soja ou au pois recrutés dans le cadre du programme Europrevall.....	186
Tableau 22 : Caractéristiques cliniques des patients recrutés dans le cadre du programme Allergest.	187

Tableau 23 : Caractéristiques cliniques des patients de la sérothèque constituée en collaboration avec le Dr E. Paty.....	188
Tableau 24 : Dosage des IgE totales et spécifiques de Cor a 11, Cor a 9, rCor a 1.04 et rCor a 8 dans les sérums de patients allergiques à la noisette.....	202
Tableau 25 : Dosage des IgE totales et spécifiques de l'EPBA dans les sérums des patients allergiques à l'arachide collectés dans le cadre d'EuroPrevall.....	205
Tableau 26 : Dosage des IgE totales et spécifiques de l'EPBA dans d'autres sérums de patients allergiques à l'arachide	206
Tableau 27 : IC50 (µg/mL) obtenues en test de capture d'IgE avec Ara h 1 - N, - C et - CG et Ara h 1 grillée en compétiteurs.....	210
Tableau 28 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par Ara h 1 - N, - C, - CG ou grillée.....	212
Tableau 29 : IC50 (µg/mL) obtenues en test de capture d'IgE avec Ara h 1 - N, - C et - CG et Ara h 1 grillée en compétiteurs pour les pools de sérums de souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF et en alum.....	219
Tableau 30 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL 2H3 induites par Ara h 1 - N, - C, - CG ou grillée	220

Cette thèse a été réalisée dans l'Unité INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA), implantée au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse / Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse (CEA de Saclay). Les travaux réalisés entrent en partie dans le cadre du programme Européen EuroPrevall. Elle a ainsi pu être financée par ce programme et par le département Alimentation Humaine dont l'UIAA dépend.

Elle porte sur le développement d'un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Ce modèle cellulaire a été appliqué à l'étude du potentiel allergénique des protéines du lait de vache et de l'arachide, et à l'étude de l'effet des traitements thermiques sur l'allergénicité d'une protéine de l'arachide, Ara h 1. Après avoir défini l'allergie alimentaire, sa prévalence et ses symptômes, nous décrirons les acteurs et les mécanismes de l'allergie alimentaire afin de justifier l'intérêt d'un tel modèle cellulaire. Nous verrons également l'importance des allergies à l'arachide et au lait de vache, tant du point de vue de leur prévalence que de la gravité des symptômes qu'elles engendrent. Dans un second temps, nous décrirons les outils d'évaluation de l'allergénicité des aliments et nous ferons une revue de la littérature de l'effet des traitements (digestion, traitement thermique, procédés industriels, ...) sur l'allergénicité des aliments/protéines allergéniques. Ces données bibliographiques nous ont permis de définir les objectifs de ce travail de thèse, qui seront exposés à la fin de ce chapitre.

I. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

En elles-mêmes les protéines alimentaires, sources de matières premières et d'énergie indispensables à l'organisme, ne constituent pas un danger pour l'organisme. Cependant, le système immunitaire de certaines personnes génétiquement prédisposées développe une réaction spécifique et inappropriée contre ces intrus devenant alors des allergènes. La réponse ainsi initiée engendre une cascade de réactions inflammatoires à l'origine de la symptomatologie.

I.1. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE : DEFINITIONS, PREVALENCE ET SYMPTOMES

I.1.1. Définitions et classifications

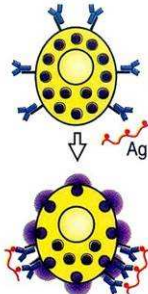
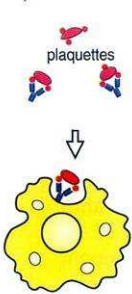
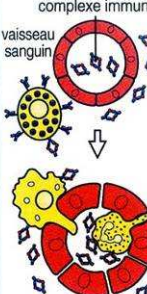
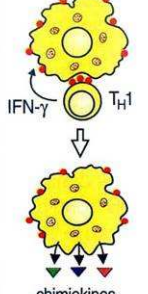
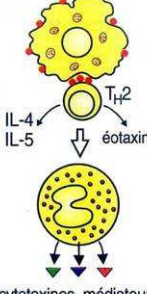
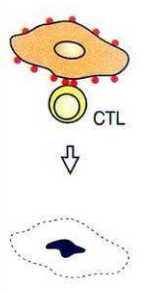
Les réactions adverses dues aux aliments sont un phénomène connu depuis plusieurs siècles. Hippocrate a reconnu, dès le V^{ème} siècle avant Jésus-Christ, que le lait de vache pouvait causer des troubles digestifs et de l'urticaire. Au II^{ème} siècle après Jésus-Christ, Galen décrit un enfant qui développe des symptômes typiques d'une réaction allergique suite à l'ingestion de lait de chèvre. Cependant, il faudra attendre le XX^{ème} siècle pour définir les bases de l'allergie. En 1902, Portier et Richet décrivent le phénomène d'anaphylaxie. En 1906, von Pirquet introduit la notion d'« allergie », qui désigne une altération de la réactivité immunitaire de l'hôte face à une substance étrangère qui provoque divers effets nocifs lorsque l'hôte se trouve à nouveau en contact avec cette substance. Le terme « allergie » vient du grec *allos* (autre) et *ergon* (action). En 1921, Prausnitz et Küstner ont mis en évidence la présence d'un facteur présent dans le sérum d'un patient allergique, baptisé « réagine », capable d'entraîner une réaction cutanée immédiate. Ce n'est qu'à la fin des années soixante qu'Ishizaka et coll. aux Etats-Unis [1] et Johansson et Bennich en Suède [2] démontrent que les réagines appartiennent à une cinquième classe d'immunoglobuline : les immunoglobulines de type E (IgE) [3].

Initialement, les réactions d'hypersensibilité ont été réparties en quatre catégories par Gell et Coombs (1963) en fonction de la vitesse de survenue de la réaction et du mécanisme immunologique principal à l'origine des lésions tissulaires et de la maladie (tableau 1). On distingue les réactions d'hypersensibilité de différents types :

- **type I : immédiate, médiée par les IgE.** Les réponses de type I sont induites par les IgE, via l'activation des mastocytes et des basophiles. C'est la réaction la plus souvent impliquée dans le cas de l'allergie alimentaire. Son mécanisme sera décrit en détail par la suite.
- **type II : cytotoxique et cytolytique.** Les réponses de types II sont induites par la liaison d'IgG à des antigènes de la surface cellulaire ou de la matrice extra-cellulaire. Ces anticorps sont alors capables d'entraîner la destruction de la cellule cible portant ces antigènes de surface par activation du complément ou de cellules NK.

- **type III : semi-tardive, à complexes immuns.** Les réponses de type III sont causées par le dépôt tissulaire ou vasculaire de complexes immuns antigène-anticorps capables d'activer le complément et de recruter les cellules sanguines polynucléaires et les macrophages, contribuant à des lésions tissulaires locales.
- **type IV : retardée, à médiation cellulaire.** Les réactions d'hypersensibilité de type IV impliquent les cellules T et peuvent être réparties en trois groupes. Dans le premier groupe, les lésions tissulaires sont liées à l'activation des macrophages par les cellules T auxiliaire de type 1 (T helper 1 ou Th1, voir paragraphe I.2.1.2.b), et à la réaction inflammatoire qui s'ensuit. Dans le second groupe, elles sont liées à une réaction inflammatoire initiée par les cellules T auxiliaire de type 2 (Th2) et dans laquelle les éosinophiles jouent un rôle prédominant. Dans le troisième groupe, les lésions sont causées directement par les cellules T cytotoxiques (CTL).

Tableau 1 : Classification de Gell et Coombs

	Type I	Type II	Type III	Type IV		
Facteur immuni-taire en cause	IgE	IgG	IgG	Cellules T _H 1	Cellules T _H 2	CTL
Antigène	Antigène soluble	Antigène associé à la cellule ou à la matrice	Antigène soluble	Antigène soluble	Antigène soluble	Antigène cellulaire
Mécanisme effecteur	Activation des mastocytes	Cellules FcR ⁺ (phagocytes, cellules NK)	Cellules FcR ⁺ Complément	Activation des macrophages	Activation des éosinophiles	Cytotoxicité
						
Exemple de réaction d'hypersensibilité	Rhinite allergique, asthme, anaphylaxie systémique	Allergie à certains médicaments (e.g. pénicilline)	Maladie sérique, réaction d'Arthus	Dermatite de contact, réaction tuberculinique	Asthme chronique, rhinite allergique chronique	Dermatite de contact

(extrait de Janeway et coll. [4]).

Cette nomenclature classique a été redéfinie au vu des nouvelles connaissances immunologiques. Au cours de l'année 2001, l'Académie Européenne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique (EAACI) a publié une nomenclature révisée des termes utilisés en

allergologie qui distingue au sein des réactions adverses aux aliments, « les réactions toxiques et les réactions non toxiques » (figure 1) [5;6]. Les réactions toxiques sont liées à des contaminants, par exemple une toxine bactérienne (intoxication et intoxication alimentaires). Les réactions non toxiques peuvent quant à elles être immunologiques ou non immunologiques. L'allergie alimentaire, ou hypersensibilité aux aliments, se réfère aux réactions impliquant des mécanismes immunologiques.

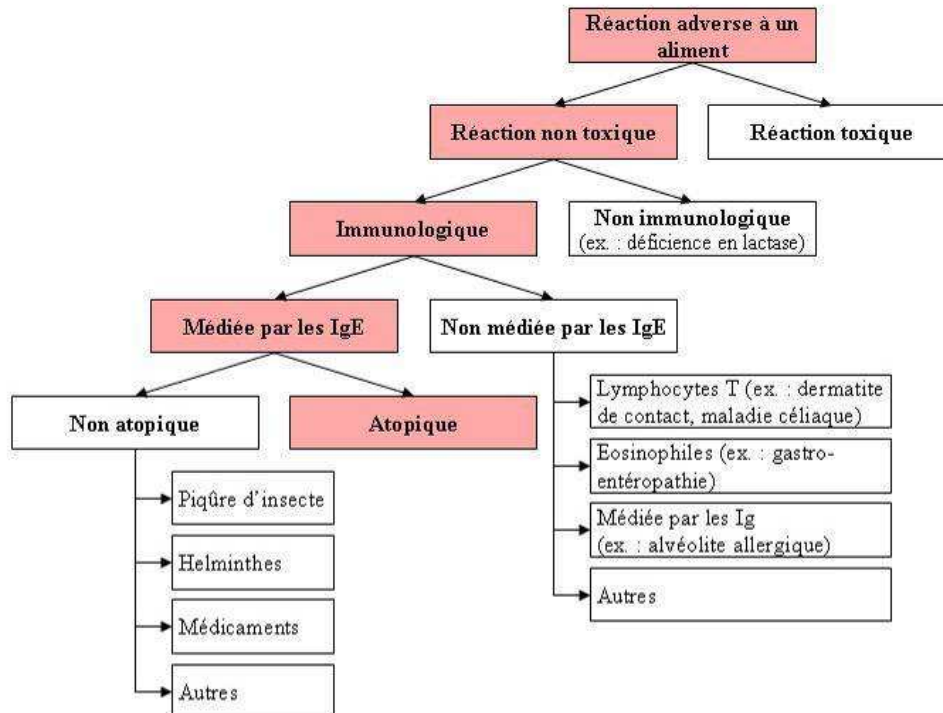


Figure 1 : Algorithme détaillé des mécanismes des manifestations cliniques d'hypersensibilité
(d'après Johansson et coll., 2001 [5]).

L'EAACI a également redéfini les termes d'hypersensibilité, d'allergie, d'allergène et d'atopie :

- L'**hypersensibilité** correspond à l'apparition de symptômes ou de signes objectivement reproductibles, provoqués par l'exposition à un stimulus précis et à une dose tolérée par des sujets normaux.
- L'**allergie** est une réaction d'hypersensibilité initiée par un mécanisme immunologique. Le médiateur peut être immunoglobulinique (IgE ou IgG) ou cellulaire (lymphocytes). Les allergies dépendantes des IgE sont les plus classiques et concernent certains asthmes et rhinites, la plupart des allergies alimentaires, les allergies aux venins d'hyménoptères et certaines allergies médicamenteuses.

- Les **allergènes** sont les antigènes entraînant les allergies. Pour les réactions IgE-dépendantes, ce sont préférentiellement des glycoprotéines, voire des glucides seuls, plus rarement des molécules de faible poids moléculaire (isocyanates ou anhydrides). Pour les réactions cellulaires, il s'agit de médicaments ou de molécules de faible poids moléculaire comme le chrome, le nickel ou le formaldéhyde.
- L'**atopie** est la tendance individuelle ou familiale à produire des IgE en réponse à des antigènes inoffensifs et à développer un symptôme typique tel que l'asthme, la rhino-conjonctivite ou l'eczéma.

Durant mes travaux de thèse, nous nous sommes essentiellement intéressés aux allergies alimentaires induites par des hypersensibilités allergiques médiées par les IgE.

I.1.2. Prévalence de l'allergie alimentaire

Environ 12% de la population se considèrent allergiques à au moins un aliment [7]. Cependant, la prévalence réelle de l'allergie alimentaire, définie par des critères objectifs (données cliniques et tests) s'avère plus faible que celle perçue par la population. Une étude réalisée en Allemagne a montré que l'allergie alimentaire est confirmée par test de provocation orale (TPO) chez seulement 1 enfant sur 10 qui avaient déclaré avoir une allergie alimentaire [8]. La prévalence réelle de l'allergie alimentaire varie avec l'âge. Elle passerait de 6 à 8% chez les enfants de moins de 3 ans [9;10] à 3,2% chez les adultes [7;11]. Les données du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA) montrent également « l'évolution naturelle de l'allergie alimentaire » en fonction de l'âge (figure 2). Il faut tout de même préciser que cette évolution naturelle de l'allergie alimentaire est pondérée par l'aliment en cause. Ainsi, si les allergies au lait de vache [12;13], à l'œuf [14] ou au soja [15;16] ont tendance à disparaître au cours de la croissance des enfants, à l'inverse, les allergies à l'arachide [17;18], aux noix [19], au sésame [20] et aux poissons et crustacés [21] guérissent beaucoup moins fréquemment.

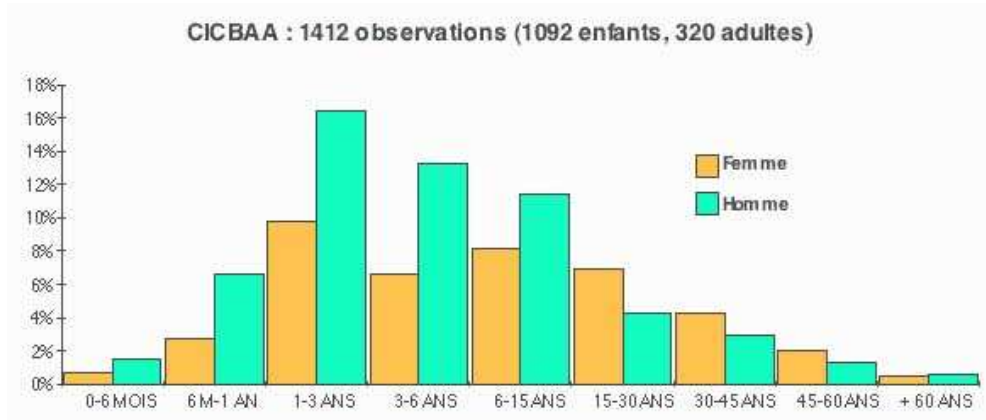


Figure 2 : Fréquence des allergies alimentaires selon l'âge et le sexe
(données du CICBAA, mai 2007 [22]).

Loin d'être figée, l'allergie alimentaire est en constante évolution, avec notamment une nette augmentation de son incidence dans les pays industrialisés. L'allergie à l'arachide reflète bien cette évolution, avec des progressions inquiétantes. Deux études ont été réalisées sur l'île de Wight en suivant 2 cohortes d'enfants nés entre 1989-1990 et 1994-1996. En 5 ans, la prévalence de l'allergie à l'arachide, prouvée par des TPO positifs, avait doublé et la sensibilisation à l'arachide (c'est-à-dire la présence d'IgE spécifiques aux protéines d'arachide) avait triplé [23]. Une équipe américaine a également réalisé deux études, à 5 ans d'intervalle (1997 et 2002), en utilisant les mêmes questionnaires téléphoniques. Ces études démontrent que la prévalence de l'allergie à l'arachide aurait doublé chez l'enfant [24;25].

I.1.3. Symptômes cliniques

Les manifestations allergiques consécutives à l'ingestion d'aliments sont très diverses. Elles peuvent intéresser tous les organes et diffèrent selon le mécanisme impliqué. Les symptômes les plus courants sont rapportés dans le tableau 2. L'origine allergique de certains symptômes, par exemple le syndrome de fatigue chronique ou la migraine, reste controversée [26].

Tableau 2 : Principaux symptômes de l'allergie alimentaire

Type de réaction	Organe cible	Tableau clinique	Symptomatologie
Cutanées	peau	dermatite atopique (ou eczéma atopique)	• Lésions d'eczéma (mal limitées, érythémateuses) sur le visage, faces d'extension des muscles, siège, plis de flexion. • Prurit.
	peau	urticaire aiguë	• Dermatose éruptive due à un œdème dermique secondaire à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité capillaire. • Présence de papules roses œdémateuses, prurigineuses.
	muqueuses	œdème de Quincke ou angio-œdème	• Dermatose due à un œdème hypodermique pouvant être fatal s'il touche la muqueuse pharyngo-laryngée. • Tuméfaction blanc rosé, non prurigineuse mais accompagnée d'une sensation de tension.
Bucco-gastro-intestinales	muqueuse buccale	syndrome oral de Lessof	• Prurit et œdème labial, gingival, buccal, voire un œdème de la glotte.
	intestins		• Nausées, vomissements, douleurs abdominales, épisodes diarrhéiques, reflux gastro-œsophagien.
Respiratoires	muqueuse nasale	rhino-conjonctivite	• Obstruction et prurit nasal (inflammation de la muqueuse), toux et crise d'éternuement, conjonctivite.
	poumon	asthme	• Constriction bronchique conduisant à une gêne respiratoire, avec dyspnée sifflante due principalement à une libération d'histamine.
Systémiques		choc anaphylactique	• Insuffisance circulatoire aiguë, provoquée par une vasodilatation primitive périphérique liée à la libération massive de médiateurs. • Mise en jeu du pronostic vital.

(d'après le rapport de l'AFSSA [27]).

L'anaphylaxie est une réaction d'hypersensibilité sévère, généralisée ou systémique, potentiellement mortelle. Des cas d'anaphylaxies dépendant de l'exercice physique et de l'ingestion d'aliments ont également été rapportés, notamment dans le cadre de l'allergie au blé [28]. L'incidence des anaphylaxies se produisant suite à l'ingestion d'un aliment varie selon les régions. Ainsi, une étude réalisée au Danemark par Sorensen et coll. rapporte une incidence annuelle de 0,32 pour 100000 habitants [29]. Une étude réalisée aux Etats-Unis par Yocum et coll. rapporte une incidence annuelle beaucoup plus importante qui s'élève à 7,6 pour 100000 habitants [30]. Sampson estime qu'aux Etats-Unis 30000 épisodes d'anaphylaxies suite à l'ingestion d'un aliment ont lieu chaque année, conduisant à 2000 hospitalisations et à 150 à 200 décès [31]. En France, en 2007, 139 cas de réactions allergiques graves liées à l'ingestion d'aliment ont été enregistrés [22]. Il s'agit d'une réaction

systémique sérieuse dans 63% des cas, un choc anaphylactique dans 25% des cas, un angio-œdème laryngé dans 14% des cas et un asthme aigu grave dans 4% des cas. Dans 2 cas, l'anaphylaxie a conduit au décès du patient (un enfant et un adulte). Les aliments les plus fréquemment impliqués dans ces réactions sont les fruits secs à coque (19%), l'arachide (12%), les fruits croisant avec le latex (11%), les crustacés (8%), les légumineuses (7%), la farine de blé (6%), le lait de vache (6%), les mollusques (6%), le céleri (4%) et l'œuf (4%).

Le patient souffrant d'allergie alimentaire peut présenter seulement un symptôme isolé mais, le plus souvent, il existe une association de symptômes impliquant différents organes. Une étude réalisée en France par Kanny et coll. sur 724 sujets (adultes et enfants) enregistre en moyenne 1,82 symptômes par sujet [11]. Dans cette étude, la répartition des manifestations cliniques était la suivante : urticaire (57%), angio-œdème (26%), symptômes gastro-intestinaux (22%), eczéma (10%), migraine (10%), rhinite (6,5%), syndrome oral (6,5%), asthme (5,7%), choc anaphylactique (2,7%) et conjonctivite (1,4%). L'eczéma diminue avec l'âge au profit de l'angio-œdème, de l'urticaire et du choc anaphylactique. Une autre étude française portant sur 544 enfants allergiques, âgés de 0 à 15 ans, conforte ces observations, les manifestations cliniques observées étant la dermatite atopique (50,5%), l'urticaire généralisé et/ou angio-œdème (30,3%), l'asthme (8,6%), le choc anaphylactique (4,9%), l'œdème laryngé (4,2%), des symptômes gastro-intestinaux (2%), le syndrome oral (1,4%) et la rhino-conjonctivite (0,3%). La fréquence de ces symptômes était différente en fonction de l'âge des patients. Ainsi, la fréquence de la dermatite atopique diminuait avec l'âge (68% chez les jeunes enfants de moins de 3 ans et 16% chez les enfants de 6 à 15 ans), tandis que d'autres signes cliniques comme l'œdème laryngé, l'angio-œdème, l'asthme et le choc anaphylactique étaient plus fréquents chez les enfants les plus âgés [32].

I.1.4. Facteurs influençant la survenue d'une réaction allergique alimentaire

I.1.4.1. Facteurs génétiques

L'hérédité joue un rôle indiscutable dans l'allergie. L'étude de la prévalence de l'allergie alimentaire à l'arachide chez des jumeaux montre que 7% des jumeaux hétérozygotes et 64% des jumeaux homozygotes partagent cette allergie, soulignant l'importance de la génétique dans la genèse de l'allergie. Dans cette étude, la probabilité

d'hériter de l'allergie à l'arachide est estimée à plus de 80% [33]. Une très grande proportion des patients ayant une allergie alimentaire ont un terrain atopique et montrent généralement d'autres désordres atopiques, que ce soit des manifestations cliniques d'atopie (dermatite atopique, asthme, rhume des foins,...) ou une histoire allergique à au moins un autre aliment. Par exemple, dans la population d'étude de Skolnick et coll. constituée de 223 enfants ayant une allergie alimentaire à l'arachide, seulement 5% des patients ne rapportent pas de désordre atopique [18]. Un phénotype atopique chez un ou deux parents augmente substantiellement les chances d'être atopique pour la descendance [34]. Ainsi, une histoire familiale d'atopie est constatée pour une forte proportion (64 à 85%) des patients allergiques [32;35;36]. Des probabilités ont ainsi été évoquées dans la littérature : lorsqu'un des parents est atteint, le risque pour l'enfant de développer une allergie est de 30 à 50%, lorsque ce sont les deux parents, le risque est de 50 à 75% [37].

L'atopie n'est pas une maladie héréditaire monogénique. De nombreuses études ont permis d'établir une relation entre l'atopie et des variations génétiques dans la région du chromosome 5 codant plusieurs gènes de cytokines produites par les lymphocytes Th2, en particulier l'IL-4 (interleukine-4) [38], l'IL-13 [39], l'IL-5 [40] et l'IL-9 [41]. D'autres corrélations génétiques ont été établies avec des variations alléliques du gène du récepteur de l'IL-4 [38;39;42] et avec des variants des chaînes α et β du récepteur de haute affinité pour les IgE [38;43]. Le gène du facteur de transcription et d'activation STAT-6 est également impliqué dans la prédisposition aux maladies atopiques [38;44-46]. Le polymorphisme des gènes HLA classe II joue également un rôle dans la susceptibilité de l'allergie à l'arachide et aux noix [47;48]. Ces études démontrent clairement l'origine multigénique de l'atopie.

Cependant, tous les enfants génétiquement prédisposés à l'atopie ne développent pas d'allergie. Par ailleurs, l'augmentation importante de l'incidence de l'allergie sur les 20 dernières années ne peut être expliquée uniquement par des facteurs génétiques. En plus d'un terrain génétique, des facteurs environnementaux vont ainsi affecter la susceptibilité de survenue de réactions allergiques.

I.1.4.2. Facteurs environnementaux et hypothèse hygiéniste

L'hypothèse hygiéniste a été développée en 1989 par Strachan qui avait observé que le nombre de cas de rhinite allergique est moins élevé dans les familles nombreuses chez lesquelles le risque des nouveau-nés à contracter des infections est plus élevé [49]. Cette hypothèse repose également sur la constatation que les populations rurales, où les règles et

statuts d'hygiène sont moins stricts, ont de plus faibles survenues de maladies atopiques comparées aux populations urbaines. Filipiak et coll. ont montré que les résidents des villages ont une prévalence plus faible de rhinite allergique, de sensibilisation atopique et de sensibilisation aux pollens que les résidents des villes [50]. Plus récemment Douwes et coll. ont décrit qu'une exposition prolongée dans un environnement rural entraîne une diminution de la survenue de maladies atopiques [51]. Cette hypothèse est corroborée par le fait que l'utilisation d'antibiotiques augmente le risque d'allergie [52]. Le principe de l'hypothèse hygiéniste, qui a été modulé depuis son émission, repose sur le fait que chez le nouveau-né, le système immunitaire est biaisé vers une réponse de type Th2, favorisant donc le développement d'une réponse allergique. L'exposition du nouveau-né à l'environnement, source de bactéries, virus et parasites, ainsi que la colonisation du tractus gastro-intestinal par une flore commensale riche et variée, permettent la maturation du système immunitaire et l'induction des différentes cellules inductrices, mais aussi et surtout régulatrices, qui assurent le développement de réponses immunitaires adaptées et *in fine* le maintien de l'intégrité de l'organisme. Ainsi, l'exposition de l'organisme à des agents infectieux permettrait le développement de réponses immunitaires adéquates et limiterait le développement de réponses inappropriées et exagérées telles que les maladies auto-immunes ou les allergies.

D'autres facteurs environnementaux peuvent également favoriser la sensibilisation allergique, comme le tabagisme passif [53], la pollution ou le stress.

I.1.4.3. Autres facteurs

De nombreux autres facteurs entrent également en jeu dans la survenue de l'allergie alimentaire. Selon une autre hypothèse, les allergies alimentaires pourraient résulter d'une trop grande perméabilité des muqueuses gastro-intestinale et/ou buccale aux antigènes alimentaires. Chez le nouveau-né, l'immaturité du système digestif conduit à l'absorption de protéines entières, ce processus permettant l'acquisition d'une immunité passive par absorption des immunoglobulines du colostrum de la mère, mais pouvant également conduire à un passage important de protéines alimentaires telles que les protéines du lait de vache, source alimentaire et allergénique majeure chez le nourrisson. Le système digestif est d'autant plus immature si l'enfant est né prématurément. De ce fait, pour le nouveau-né, il est conseillé de retarder l'introduction d'une alimentation variée et de différer à quatre mois l'introduction d'aliments solides [54].

Une fois que le système digestif est mature, des conditions pathologiques peuvent conduire à une augmentation temporaire de la perméabilité intestinale et donc au passage d'antigènes non ou peu dégradés. C'est le cas par exemple après certaines infections virales [55] ou suite à une réaction d'anaphylaxie intestinale. Outre le passage de l'allergène en cause, ce dernier type de réaction peut permettre celui d'autres antigènes présents au même moment dans la lumière intestinale [56;57]. Cette situation faciliterait la sensibilisation à ces antigènes et expliquerait en partie les sensibilisations alimentaires multiples. Certains composants bioactifs de l'aliment peuvent également agir directement sur la muqueuse intestinale et en augmenter la perméabilité [58]. D'autres facteurs, comme l'alcool, peuvent également augmenter la perméabilité intestinale et favoriser l'absorption des allergènes.

I.2. ACTEURS ET MECANISME DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE DE TYPE I

L'allergie alimentaire se déroule classiquement en deux étapes. La première étape est la phase de sensibilisation. Au cours de cette étape, les principaux événements sont la production des IgE spécifiques d'un antigène et la liaison de ces IgE à leur récepteur notamment sur les mastocytes et les basophiles. Cette étape est muette cliniquement et ce n'est qu'après un contact ultérieur avec l'allergène, lors de la phase de déclenchement, que surviennent les manifestations cliniques allergiques : l'agrégation des IgE spécifiques liées à leur récepteur par l'allergène entraîne la libération, par les cellules effectrices, des médiateurs de la réaction allergique.

Avant d'aborder plus en détail le mécanisme de cette réaction allergique, nous allons décrire certains de ses intervenants.

I.2.1. Les acteurs de l'allergie alimentaire

I.2.1.1. Les IgE et les récepteurs aux IgE

I.2.1.1.a. Les IgE

Les IgE ont été découvertes à la fin des années soixante et identifiées comme cinquième isotype d'immunoglobuline [1;2]. L'IgE est la moins abondante des Ig : chez

l'adulte normal, son taux physiologique moyen est très faible (100 ng/mL, soit environ 40 UI/mL), ce qui représente 100000 fois moins que la concentration des IgG. Chez les individus atopiques, la concentration en IgE sériques augmente et elle est globalement plus importante chez les individus allergiques. Cependant, les concentrations en IgE totales sériques sont sujettes à d'importantes variations physiologiques intra- et inter-individuelles. Alors que la demi-vie sérique des IgE est faible (environ 2,5 jours), les IgE fixées à la surface des mastocytes et des basophiles peuvent persister jusqu'à 12 semaines. A la différence des autres isotypes d'Ig, les IgE sont thermolabiles : elles sont fonctionnellement détruites par un chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

L'IgE est une glycoprotéine composée de deux chaînes légères identiques, comportant un domaine constant (C_L) et un domaine variable (V_L), et de deux chaînes lourdes identiques comportant 4 domaines constants de type $C\epsilon$ ($C\epsilon 1-4$) et un domaine variable (V_H) (figure 3). Elle se distingue donc des IgG humaines par la présence d'un domaine constant supplémentaire. De masse relative de 188 kDa, elle comporte 12% de résidus glucidiques. Les parties N-terminales des chaînes légères et lourdes sont très variables et forment le site de liaison à l'antigène. Les parties C-terminales constantes des chaînes lourdes forment la région F_c et contiennent le site de liaison aux récepteurs pour les IgE ($Fc\epsilon R$). Deux types de récepteurs pour les IgE ont été identifiés : le récepteur de haute affinité ($Fc\epsilon RI$) et le récepteur de faible affinité ($Fc\epsilon RII$ ou CD23).

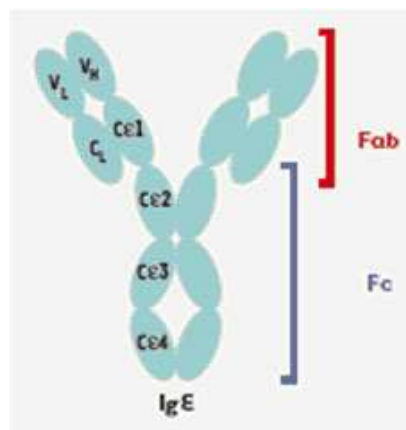


Figure 3 : Représentation schématique d'une immunoglobuline E

(Fc : fragment constant ; Fab : fragment de reconnaissance de l'antigène ; Cε1-4 : domaines constants de la chaîne lourde ; C_L : domaine constant de la chaîne légère ; V_H : domaine variable de la chaîne lourde ; V_L : domaine variable de la chaîne légère)
(extrait de Blank et coll., 2003 [59]).

I.2.1.1.b. Le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI)

Le FcεRI est abondamment exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles [60;61]. Malgré une concentration sérique peu élevée des IgE (100 ng/mL), elles occupent en permanence une proportion appréciable de ce récepteur du fait de la haute affinité de cette liaison ($KD = 10^{-9}$ à 10^{-11} M) [62].

Le FcεRI est un complexe membranaire tétramérique composé d'une chaîne α, d'une chaîne β et d'un dimère de chaînes γ (figure 4). La chaîne α constitue le module de liaison du ligand IgE [63;64]. Il s'agit d'une protéine transmembranaire formée d'une partie extracellulaire (ECα) constituée de deux domaines de type immunoglobulinique (D1 et D2), d'un segment transmembranaire et d'un court segment cytoplasmique. Outre le fait que le site de liaison à l'IgE est situé sur la partie ECα [64], cette sous-unité a également un rôle dans le processus de signalisation intracellulaire et dans l'expression du récepteur à la surface de la cellule [65]. Les chaînes β et γ n'ont pas de rôle dans la liaison de l'IgE, mais elles représentent le module de signalisation du récepteur. La chaîne β est une protéine très hydrophobe, traversant quatre fois la membrane, dont les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. Les chaînes γ sont des protéines transmembranaires dotées d'un court domaine extracellulaire et d'une région cytoplasmique relativement longue. Les parties cytoplasmiques C-terminales de la chaîne β et des chaînes γ contiennent des motifs ITAM (de l'anglais Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nécessaires à l'activation cellulaire. La partie cytoplasmique de la chaîne γ est essentielle à la transduction de ce signal

[66] tandis que la chaîne β a un rôle amplificateur de la signalisation via le Fc ϵ RI. Il a en effet été montré *in vitro*, dans des cellules transfectées par tout ou partie du récepteur, que la capacité du tétramère ($\alpha\beta\gamma_2$) à transmettre le signal d'activation est 3 à 5 fois plus importante que celle du trimère ($\alpha\gamma_2$) [67;68]. Ces résultats ont été confirmés à l'aide de souris dont le gène de la chaîne β a été désactivé [69]. Une autre fonction de la chaîne β a également été décrite : l'introduction de la chaîne β dans des cellules exprimant le trimère $\alpha\gamma_2$ entraîne une augmentation significative des niveaux d'expression du Fc ϵ RI à la surface des cellules [67].

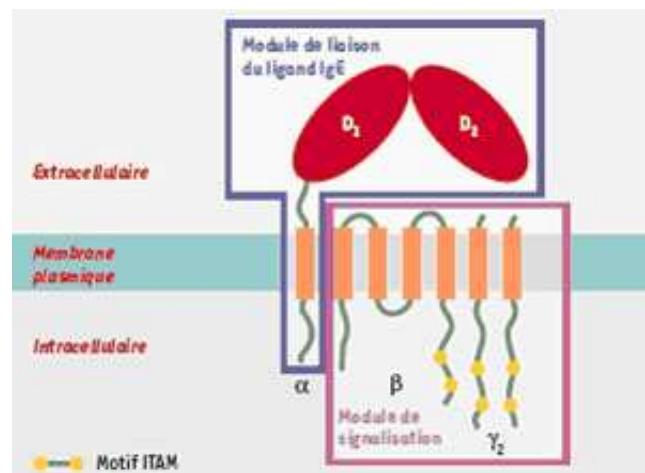


Figure 4 : Représentation schématique du Fc ϵ RI
(extrait de Blank et al., 2003 [59]).

Alors que chez la souris le Fc ϵ RI n'est exprimé qu'à la surface des mastocytes et des basophiles, chez l'homme, il est distribué plus largement. De plus, le récepteur humain existe également sous la forme d'un trimère $\alpha\gamma_2$ sans chaîne β [70]. Les mastocytes et les basophiles expriment le Fc ϵ RI sous ses deux formes tandis que la forme trimérique du Fc ϵ RI est exprimée par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (monocytes/macrophages [71], cellules dendritiques [70], cellules de Langerhans [72;73]) ainsi que par les éosinophiles [74]. Le rôle de la chaîne β dans l'expression du Fc ϵ RI permet d'expliquer les différences de densité d'expression de surface du Fc ϵ RI *in vivo* entre les cellules qui n'ont pas cette chaîne β (monocytes et cellules dendritiques) et les cellules qui l'expriment (mastocytes et basophiles). L'expression du Fc ϵ RI a été également observée sur les plaquettes [75] et sur les neutrophiles [76;77], sans qu'il ait été déterminé si le récepteur est exprimé à la surface de ces cellules sous sa forme trimérique ou tétramérique.

I.2.1.1.c. La liaison de l'IgE au FcεRI

Le site de liaison du FcεRI à l'IgE est situé dans la partie extracellulaire de la chaîne α [78]. Des études de mutagénèses dirigées sur l'IgE ont permis de localiser les sites de liaison de l'IgE au FcεRI dans le domaine Cε3 et à la jonction Cε2-Cε3 [79;80]. La résolution de la structure du complexe FcεRI-IgE a ensuite permis de montrer que cette liaison implique deux sites distincts [81] (figure 5). Le premier site est situé dans le domaine de type immunoglobuline D2 et interagit avec l'un des deux domaines Cε3 et l'une des jonctions Cε2-Cε3 de l'IgE. Le deuxième site se trouve au niveau de D2 et la jonction D1-D2, et interagit avec l'autre domaine Cε3 de l'IgE. Les deux sites de liaison des IgE sont impliqués simultanément dans la liaison au FcεRI, chacun se liant sur un site distinct, ce qui rend impossible l'interaction avec un deuxième récepteur FcεRI. Ainsi, malgré la présence de deux sites de liaison au FcεRI présents sur les chaînes lourdes des IgE, la liaison IgE-FcεRI est monovalente [82]. La forte affinité de la liaison IgE-FcεRI s'explique par la présence de ce double site de liaison, conférant à la liaison IgE-FcεRI une faible vitesse de dissociation. Des études cristallographiques et de dichroïsme circulaire ont montré qu'il y a un important changement de conformation de l'IgE lorsqu'elle se lie au FcεRI [81;83;84]

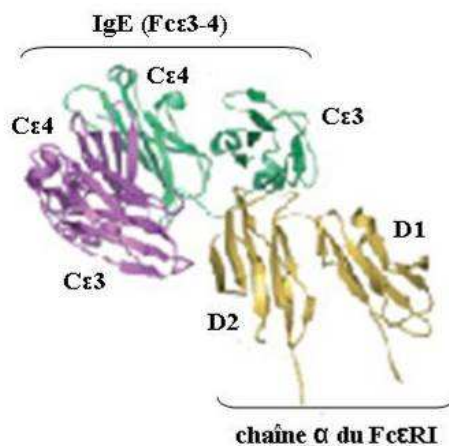


Figure 5 : Structure du complexe entre la partie Fcε3-4 de l'IgE et les domaines extracellulaires de la chaîne α du FcεRI
(d'après Gould et Sutton, 2008 [85]).

I.2.1.1.d. Régulation de l'expression du FcεRI

Chez l'homme, l'IL-4, cytokine de type Th2, peut induire l'expression de la sous-unité α du FcεRI par les mastocytes [86] et les CPA [87]. L'expression du FcεRI à la surface des

mastocytes, des basophiles [62], des monocytes [71;88], des éosinophiles [88] et des cellules dendritiques est plus importante chez des sujets atopiques que chez des sujets normaux. Une corrélation entre le taux d'IgE sériques et l'expression du FcεRI à la surface des basophiles et des monocytes a par ailleurs été observée [62;88]. En effet, les IgE agissent sur l'expression du FcεRI à la surface des mastocytes [89], basophiles [90;91], monocytes et cellules dendritiques [87]. Cette régulation positive de l'expression du FcεRI, médiée par les IgE, entraîne une augmentation des fonctions effectrices des cellules telles que la dégranulation de médiateurs par les mastocytes ou la présentation IgE-dépendante des antigènes par les cellules dendritiques. Cette régulation est le résultat de la stabilisation par le ligand des récepteurs à la surface de la cellule, qui stoppe la dégradation des récepteurs exprimés à la surface tout en maintenant la synthèse basale. Il en résulte une accumulation progressive des récepteurs à la surface de la cellule.

I.2.1.1.e. Le récepteur de faible affinité pour les IgE (FcεRII ou CD23)

Le CD23 est le second récepteur capable de lier des IgE avec toutefois une affinité plus faible que celle du FcεRI. C'est un homotrimère membranaire qui existe sous deux formes: CD23a et CD23b. La forme CD23a est constitutivement exprimée par les lymphocytes B. L'autre forme, CD23b, est induite par l'IL-4 sur les cellules T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles [92]. Le CD23 a une forte affinité pour le complexe immunitaire IgE-antigène, mais une très faible affinité lorsque l'IgE n'est pas liée à son antigène. Il joue un rôle dans la production des IgE en participant à la présentation des antigènes et à la stimulation des lymphocytes T. Il joue également un rôle dans la génération de médiateurs de l'inflammation, notamment par les éosinophiles.

I.2.1.2. Les cellules effectrices de l'allergie

I.2.1.2.a. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Les CPA sont les cellules qui prennent en charge les antigènes et qui, après dégradation intracellulaire, les présentent à leur surface cellulaire sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les CPA peuvent être des cellules dendritiques, des macrophages activés ou des lymphocytes B activés. Elles expriment les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des cellules T auxiliaires. Les cellules dendritiques sont les seules capables d'initier une réponse

immunitaire adaptative aux antigènes qu'elles présentent. Les cellules dendritiques appartiennent à trois populations différentes : les cellules de Langerhans (peau et épithéliums muqueux), les cellules dendritiques myéloïdes (tissus interstitiels, notamment le derme) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (organes lymphoïdes et sang).

I.2.1.2.b. Les lymphocytes T auxiliaires et T régulateurs

Les lymphocytes T, également appelés thymocytes ou cellules T, sont une catégorie de lymphocytes nécessaires au développement de la réponse immunitaire adaptative, spécifique de l'antigène. « T » est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur « éducation » s'achève.

Les lymphocytes T auxiliaires (T helper ou Th) portent à leur surface un marqueur spécifique, le CD4. En 1986, Mosmann et coll. ont mis en évidence, chez la souris, deux sous-populations de lymphocytes Th, dits Th1 et Th2 [93]. La différence entre ces sous-populations repose sur la nature des cytokines sécrétées et le type de réponse générée. Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ (interféron- γ) et sont impliqués dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires, bactéries ou virus notamment. Les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et sont impliqués dans la lutte contre les agents pathogènes extracellulaires, notamment certains parasites comme les Helminthes. La notion de lymphocyte Th1–Th2 a par la suite été étendue à l'homme [94;95] et les profils cytokiniques Th1 et Th2 ont depuis été affinés [96-98]. La dichotomie Th1/Th2 n'est cependant pas aussi clairement établie chez l'homme. Certaines cytokines sont communes aux deux types de lymphocytes, comme l'IL-3 et le TNF- α (tumor necrosis factor- α). Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par la sécrétion d'IL-2, IFN- γ et de TNF- β , sans IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 alors que les lymphocytes Th2 le sont par la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et d'IL-13, sans IFN- γ et TNF- β . La dualité fonctionnelle des lymphocytes Th1 et Th2 est un concept qui a été largement utilisé pour expliquer la physiopathologie de certaines maladies comme les maladies allergiques attribuées à une réponse Th2 exacerbée, mais aussi les affections auto-immunes associées à une stimulation anormale de la réponse Th1.

Les deux sous populations Th1 et Th2 dérivent d'un même précurseur, le lymphocyte T naïf (Th0), capable de sécréter toutes les cytokines de type 1 et 2. Lors d'un premier contact avec un antigène, de nombreux paramètres vont permettre l'orientation de la réponse immunitaire vers un phénotype particulier: nature et dose de l'antigène, site de la stimulation, nature des cellules présentatrices, fond génétique, environnement cytokinique, environnement

bactérien/viral et type de réponse innée initiée. La densité d'antigènes présentés par la cellule présentatrice au lymphocyte T est également un facteur qui oriente la polarisation des lymphocytes Th0. Une concentration élevée d'antigène à la surface de la cellule présentatrice induira plutôt une réponse de type Th1, alors qu'une concentration faible favorisera la réponse Th2 [99].

L'IL-12, via l'activation de STAT-4 (de l'anglais Signal Transducer and Activator of Transcription), est la cytokine de différenciation des lymphocytes Th1. L'IL-4, via l'activation de STAT-6, est la cytokine de différenciation des lymphocytes Th2. Il existe également une régulation réciproque négative entre les cellules Th1 et Th2 (figure 6). L'IFN- γ inhibe la prolifération des cellules Th2. A l'inverse, l'IL-4 et l'IL-10 produites par les lymphocytes Th2 inhibent la synthèse des cytokines par les cellules Th1.

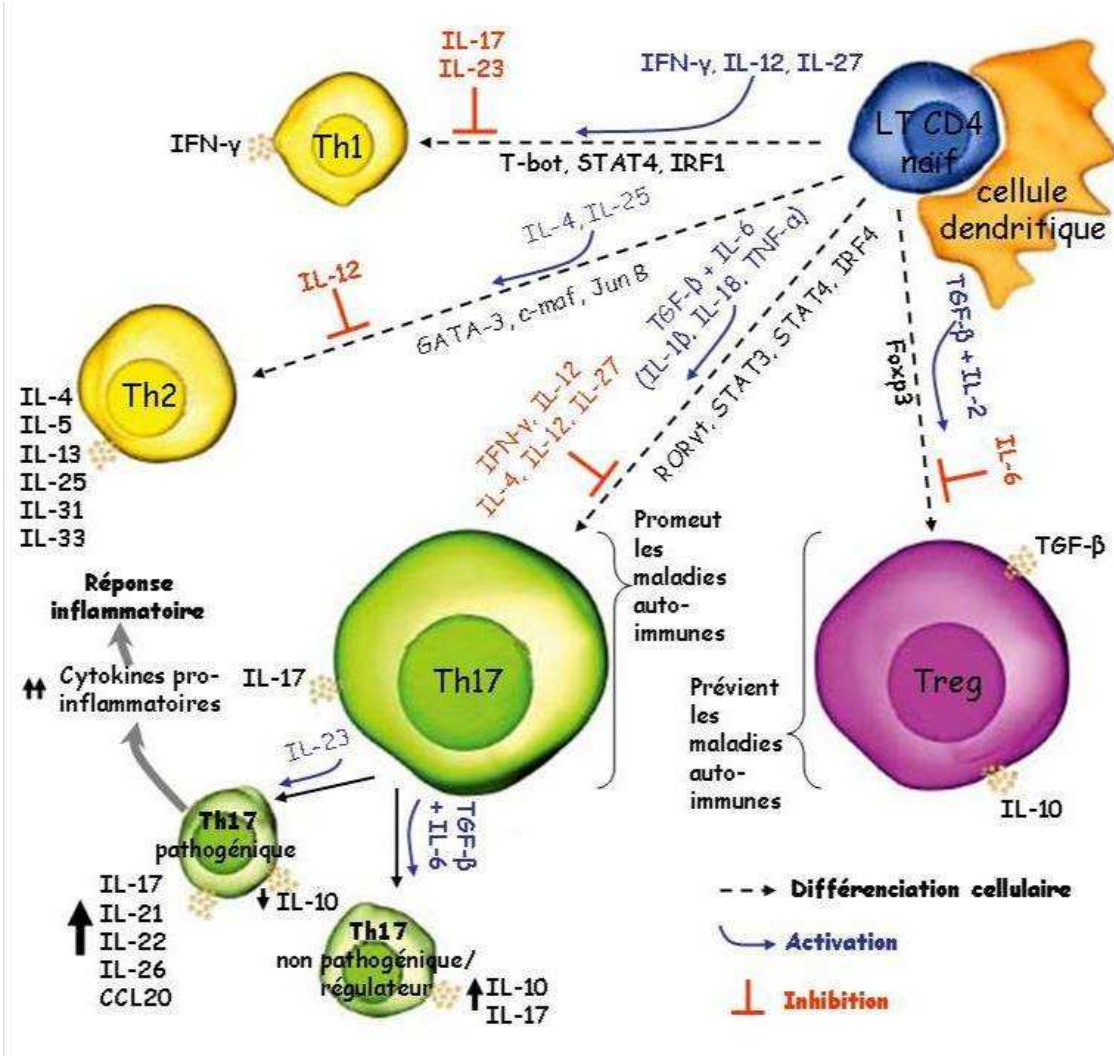


Figure 6 : Induction et régulation des cellules Th1/Th2/Th17 et T régulatrices
(d'après eBioscience (www.ebioscience.com)).

Des expériences plus récentes ont mis en évidence des mécanismes nouveaux qui perturbent le schéma du paradigme Th1/Th2. Des cellules T se différenciant en présence d'IL-6 et de TGF-β et sécrétant de l'IL-17, appelées Th17, ont récemment été mises en évidence. Elles joueraient un rôle dans de nombreuses pathologies auto-immunes mais également allergiques [100]. Par ailleurs, le maintien de l'homéostasie de l'organisme nécessite la fine régulation des réponses immunitaires induites. Ce rôle incombe aux cellules dites régulatrices. Il s'agit de plusieurs types de cellules exprimant le CD4 : les cellules Th3, Tr1 et Treg. Les cellules Th3 sont notamment induites suite à l'administration orale d'antigène et exercent leur activité suppressive via la production de TGF-β [101]. Les Tr1 sont induites en présence d'IL-10 et exercent leur activité suppressive via la production d'IL-10 [102]. Cette activité suppressive n'est pas dépendante du CMH et n'est pas spécifique de l'antigène. Un autre type

de cellule exprimant le récepteur de l'IL-2 (CD25+) à leur membrane et le facteur intracellulaire de transcription Foxp3 ont également un effet régulateur [103]. Ces cellules T régulatrices dites naturelles, ou Treg, se différencient sous l'effet du TGF- β et de l'IL-2. Elles agissent par contact direct avec d'autres cellules via le TGF- β lié à leurs membranes [104]. Les cellules Treg naturelles expriment également les molécules CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) et GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor) qui sont impliquées dans l'action immunosuppressive des Treg. *In fine*, les cellules régulatrices inhibent *in vitro* et *in vivo* la prolifération de tous les types de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻. Un défaut en cellules régulatrices serait donc à l'origine, du moins en partie, des pathologies liées aux cellules Th1 (autoimmunité) et Th2 (allergie).

1.2.1.2.c. Les lymphocytes B

Le récepteur d'antigène du lymphocyte B (BCR pour « B cell receptor ») reconnaît directement les antigènes natifs, en solution ou à la surface des CPA. Cette reconnaissance est le support de la spécificité de la réponse humorale. Un lymphocyte B donné synthétise des molécules d'immunoglobulines qui portent toutes le même paratope (site de liaison à l'épitope antigénique), mais l'affinité des anticorps produits augmente au cours de la réponse immunitaire.

1.2.1.2.d. Les granulocytes

1.2.1.2.d.i. Basophiles

Les basophiles sont des leucocytes (cellules sanguines de la lignée blanche) dont le noyau est en général formé de deux lobes. Ce sont les plus rares des granulocytes (0,5%). Se différenciant sous l'influence de l'IL-3, leur localisation est principalement sanguine. Leurs inclusions cytoplasmiques contiennent de nombreuses molécules chimiques, et en particulier histamine, sérotonine et héparine. Ils expriment fortement le Fc ϵ RI (30000 Fc ϵ RI / cellule) [62].

1.2.1.2.d.ii. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules granuleuses de 10 à 15 μ m dérivant de cellules progénitrices hématopoïétiques multipotentes. Leur différenciation finale se produit dès leur arrivée dans les tissus, principalement sous l'influence du facteur de croissance « Stem Cell Factor » (SCF), qui agit sur le récepteur de surface c-Kit. Les mastocytes sont localisés dans

les tissus muqueux et épithéliaux à proximité des petits vaisseaux sanguins et des veinules postcapillaires. Une des principales caractéristiques du mastocyte est d'exprimer à sa membrane la forme tétramérique du FcεRI : on en dénombre environ 10^5 par mastocyte. Le mastocyte se caractérise par la présence dans son cytoplasme de très nombreuses granules contenant différents médiateurs chimiques préformés. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment l'histamine et des enzymes dont la β-hexosaminidase. Le contenu de ces granules est rapidement libéré dans le milieu extracellulaire suite à l'activation des mastocytes via le FcεRI. La composition en protéoglycanes et en protéases neutres du contenu granulaire est une caractéristique du type de mastocyte [105;106]. Des sous-populations mastocytaires de type séreux (CTMC) et de type muqueux (MMC) ont été décrites chez le rat. Les CTMC contiennent dans leurs granules un protéoglycane, l'héparine, ainsi que la chymase et la tryptase, alors que les MMC sont riches en chondroïtine-sulfate et contiennent de la chymase. Chez l'homme, on distingue également les mastocytes du tissu conjonctif, qui contiennent à la fois la tryptase et la chymase (MC_{TC}), des mastocytes de type muqueux, qui contiennent uniquement la tryptase (MC_T). Suite à l'activation, les mastocytes synthétisent et libèrent également des médiateurs lipidiques comme les leucotriènes et le facteur activant les plaquettes (PAF), des chimiokines, ainsi que d'autres cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13 qui vont entretenir la réponse Th2. Si le mastocyte joue un rôle prépondérant dans les phénomènes d'hypersensibilité, il participe aussi à des mécanismes de défenses immunitaires innée et acquise. Présent dans les tissus, le mastocyte peut être activé par différents stimuli physiques, chimiques ou immunologiques et libérer des médiateurs augmentant la perméabilité vasculaire et favorisant l'afflux d'anticorps et de cellules effecteurs de la réponse immunitaire au site de l'agression.

1.2.1.2.d.iii. Eosinophiles

Cellule essentiellement tissulaire, l'éosinophile est produit dans la moelle osseuse hématopoïétique sous l'influence de diverses cytokines (IL-3, IL-4, IL-5 et GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)). L'IL-5 et l'éotaxine apparaissent spécifiques de la lignée éosinophile dont elles stimulent la migration et la différenciation. En plus de la libération des médiateurs de l'inflammation, suite à l'activation par le complexe allergène-IgE se fixant sur des récepteurs de faible affinité FcεRII, les éosinophiles sont également source de cytokines, pouvant amplifier localement la réponse de type Th2.

I.2.2. Le mécanisme de l'allergie alimentaire

I.2.2.1. Franchissement de la barrière mucoale

Il existe différentes voies de sensibilisation à des allergènes alimentaires. Les travaux réalisés sur des modèles animaux suggèrent que la sensibilisation vis-à-vis des allergènes alimentaires peut résulter d'une exposition cutanée [107-111] corroborant les observations cliniques chez des patients allergiques à l'arachide [112] ou à l'amande [113]. Il peut également s'agir d'une sensibilisation par voie respiratoire comme pour le syndrome « œuf-œuf » [114]. Cependant, le plus souvent, l'allergie alimentaire résulte d'une sensibilisation par voie orale suite à un retard d'induction ou une rupture de tolérance à des aliments ingérés.

Le système digestif, avec ses 400 m² de surface, fournit une importante surface d'échange. La digestion et l'absorption des nutriments nécessaires à l'organisme est la fonction majeure de cette surface d'échange. Le système immunitaire associé à cette muqueuse, le GALT (de l'anglais Gut-Associated Lymphoid Tissue) permet la protection face aux parasites et aux bactéries pathogènes tandis qu'une tolérance est établie face aux protéines alimentaires nécessaires à l'organisme. Les antigènes alimentaires ont 3 voies d'entrée pour traverser la barrière intestinale et rencontrer le système immunitaire (figure 7) :

- au niveau des plaques de Peyer (PP), disséminées tout le long de la partie distale de l'intestin grêle (figure 7, 1). Les PP sont constituées de follicules lymphoïdes recouverts par un épithélium contenant des cellules particulières, les cellules M (pour « microfold ») dépourvues de villosités. Ces cellules captent les macromolécules présentes dans la lumière intestinale et les transmettent sans dégradation aux cellules dendritiques sous-jacentes qui les présentent à leur tour aux cellules T de la zone T des PP. Ce transport par les cellules M serait une étape clef dans l'induction d'une réponse locale et systémique spécifique [115].
- par échantillonnage direct par les cellules dendritiques de la lamina propria, via des dendrites s'étendant dans la lumière intestinale (figure 7, 2). Ces cellules migrent ensuite dans les ganglions mésentériques où elles présentent les antigènes captés aux cellules T, initiant la réponse immunitaire spécifique. Cette voie d'activation serait notamment très importante dans les mécanismes d'induction de la tolérance orale [116].
- par endocytose des antigènes par les cellules épithéliales puis présentation aux cellules T sous-jacentes (figure 7, 3, a), ou via libération d'exosomes portant les peptides antigéniques associés aux molécules du CMH II (figure 7, 3, b).

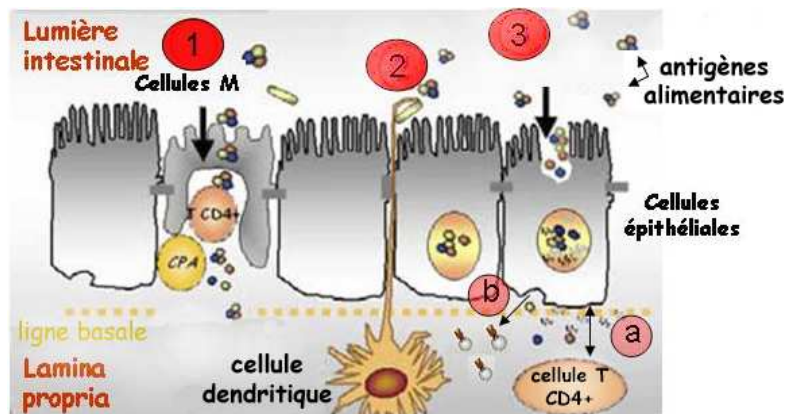


Figure 7 : Prise en charge des antigènes alimentaires présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale
(d'après Mallegol et coll., 2005 et Adel-Patient et coll., 2008 [117;118]).

I.2.2.2. Phase de sensibilisation

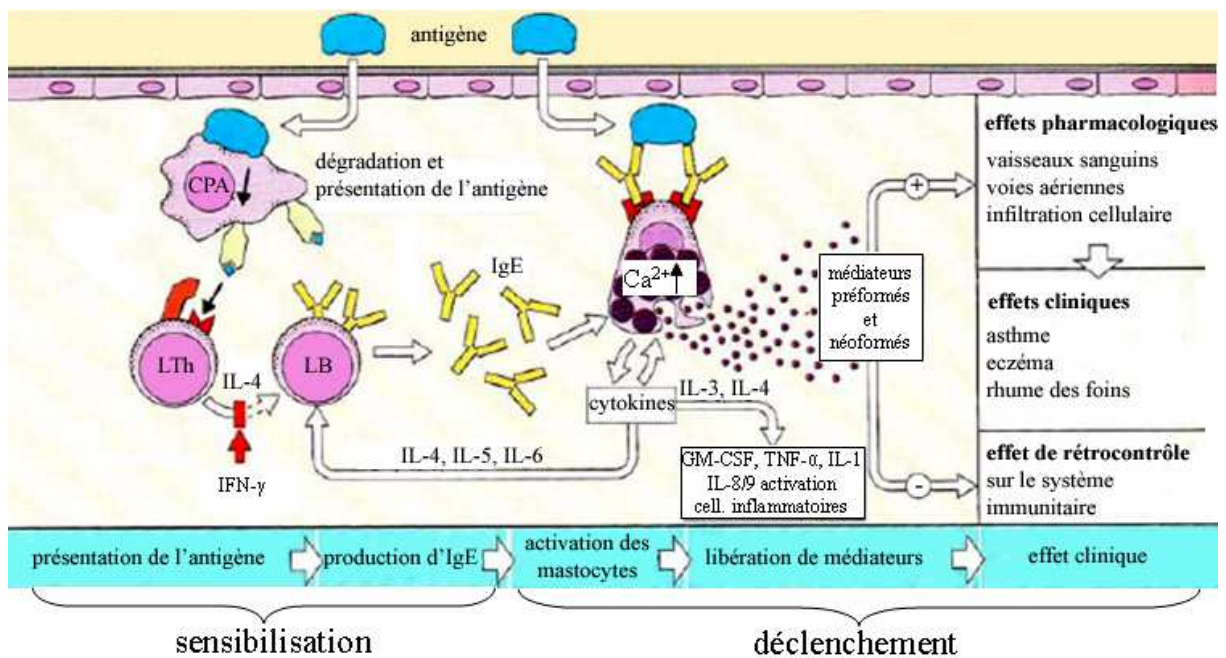


Figure 8 : Mécanisme de l'allergie alimentaire immédiate IgE-dépendante
(d'après Roitt et coll., 1994 [119]).

Alors que chez les individus normaux, les antigènes alimentaires n'induisent pas de sensibilisation allergique, chez les individus prédisposés aux allergies, la rencontre avec certains de ces antigènes entraîne l'activation des lymphocytes Th2 et la production d'IgE (phase de sensibilisation). Les antigènes qui activent sélectivement les lymphocytes Th2 inducteurs d'IgE sont qualifiés d'allergènes (figure 8, sensibilisation).

Deux composants majeurs de la réponse immunitaire mènent à la production des IgE. Le premier favorise la différenciation des cellules Th0 naïves vers le phénotype Th2. Le second est lié à l'action des cytokines et des molécules co-stimulatrices provenant des cellules Th2 qui stimulent la commutation de classe vers les anticorps IgE.

Lors de la sensibilisation allergique, les CPA captent l'antigène, et après lyse intracellulaire, associent les peptides dérivés de l'antigène aux molécules CMH II à leur surface. Les CPA migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques « locaux », où elles interagissent avec les cellules T CD4⁺ naïves, de manière à induire leur différenciation en cellules Th2, qui sécrètent des cytokines dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Ces cytokines vont notamment induire la transformation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques. La commutation de classe des plasmocytes vers l'isotype IgE est induite par deux signaux différents, chacun d'eux pouvant être fourni par les cellules Th2. Le premier est fourni par les cytokines IL-4 ou IL-13 qui interagissent avec leur récepteur à la surface des cellules B. Ces cytokines transmettent un signal en activant les tyrosines kinases Janus kinases (JAK) 1 et 3, conduisant finalement à la phosphorylation de STAT-6, un régulateur de la transcription. Bien que de nouvelles voies d'activation des cellules Th2 indépendantes de l'IL-4 puissent être impliquées [120], les souris déficientes en IL-4, IL-13 ou STAT-6 seraient partiellement incapables de développer une réponse de type Th2 et ne démontrent pas de commutation isotypique vers l'IgE, ce qui démontre le rôle clé de ces voies de signalisation dans cette différenciation [121-123]. Le second signal nécessaire à la commutation de classe vers l'IgE est la co-stimulation fournie par l'interaction entre le ligand CD40 (CD40L) à la surface des cellules T et le CD40 porté par les cellules B. Cette interaction est indispensable à la commutation de classe vers tous les isotypes.

Les raisons pour lesquelles la réponse immunitaire est orientée vers le phénotype Th2 au lieu d'une tolérance ou d'une réponse Th1 ne sont pas toutes élucidées. Parmi les différentes hypothèses avancées, dont l'hypothèse hygiéniste préalablement développée, on peut citer le fait que certains allergènes peuvent avoir un effet adjuvant intrinsèque. A titre d'exemple, les structures glycaniques présentes sur les glycoallergènes de l'arachide agissent comme des adjuvants, orientant la réponse vers une réponse Th2 [124]. Une autre raison pourrait être la présence d'un environnement pro-Th2. Par exemple, l'entérotoxine B produites par *Staphylococcus aureus* influence la polarisation des lymphocytes T naïfs à se développer en cellules Th2 [125].

Les IgE spécifiques de l'allergène se répartissent ensuite dans l'ensemble de l'organisme, via la circulation sanguine, et se fixent sur des « cellules cibles » de la peau et des muqueuses (mastocytes) ainsi que sur des « cellules cibles » circulantes (basophiles) qui expriment le FcεRI. 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.

I.2.2.3. Phase de déclenchement

I.2.2.3.a. Pontage des IgE et dégranulation des cellules effectrices

Suite à la seconde introduction de l'allergène dans l'organisme, il est reconnu par les IgE spécifiques liées aux cellules effectrices par le FcεRI. Le pontage des IgE par l'allergène multivalent, c'est-à-dire impliquant plusieurs épitopes différents, entraîne l'agrégation des FcεRI et provoque la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans les motifs ITAM du récepteur. Il en résulte le recrutement d'autres effecteurs intracellulaires et la mise en place de multiples cascades de signalisation aboutissant finalement à la « dégranulation », c'est-à-dire la libération rapide du contenu des granules et à la synthèse et à la sécrétion de médiateurs lipidiques et de cytokines (figure 8, déclenchement). Le signal intracellulaire conduisant à la dégranulation de ces cellules est complexe et peut être résumé par la figure 9.

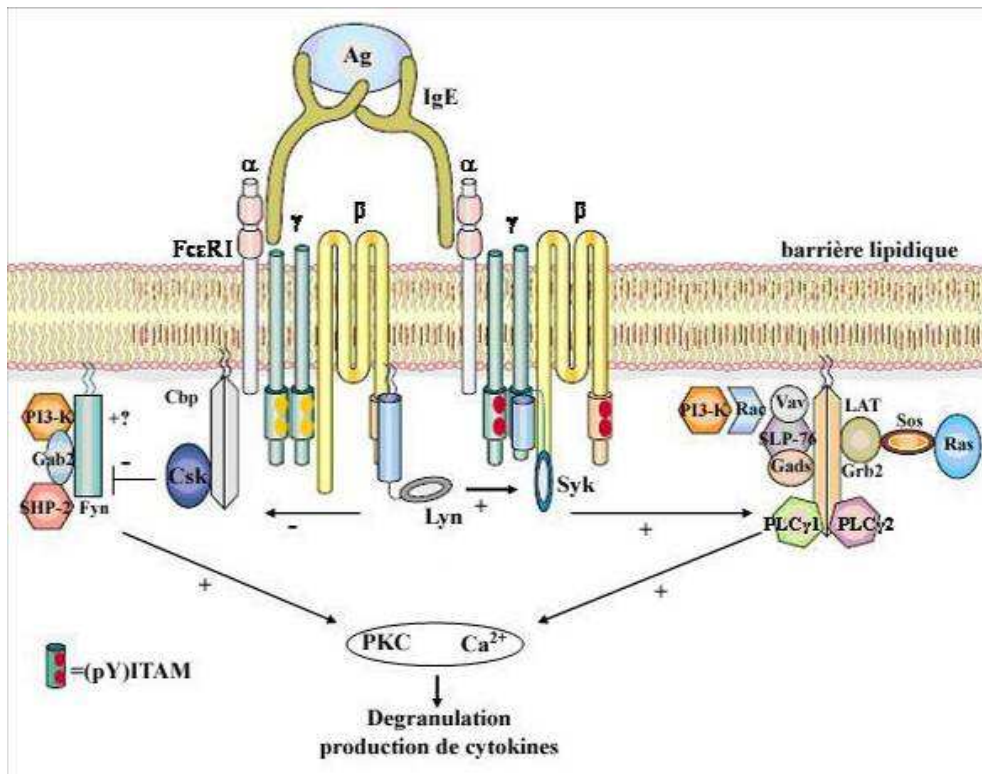


Figure 9 : Signalisation intracellulaire via le FcεRI aboutissant à la dégranulation des mastocytes et basophiles.

D'après Blank et Rivera, 2004 [126].

Lors du déclenchement de la réaction allergique, on distingue deux phases. L'une est très rapide, spasmogène, et est principalement due aux effets immédiats de l'histamine libérée dont le mode d'action se situe au niveau des récepteurs H1 des vaisseaux et des bronches. L'autre phase est plus tardive et dépend des médiateurs lipidiques, des facteurs chimiotactiques et des cytokines produits par le mastocyte/basophile activé.

I.2.2.3.b. Phase précoce

L'histamine, libérée dans les secondes qui suivent l'activation des mastocytes et/ou des basophiles, provoque la dilatation des petits vaisseaux sanguins, augmente la perméabilité vasculaire, et stimule la contraction transitoire des muscles lisses. Les protéases qui sont également libérées peuvent provoquer des lésions des tissus locaux. Des médiateurs néoformés suite à l'activation cellulaire sont également rapidement libérés. Ce sont essentiellement les métabolites de l'acide arachidonique qui comprennent la prostaglandine D2 (PGD2) et le leucotriène C4 (LTC4), et les produits issus de sa lyse (LTD4 et LTE4). Ces médiateurs stimulent la contraction prolongée des muscles lisses et augmentent la

perméabilité vasculaire. Ils jouent également un rôle chimotactique pour les cellules inflammatoires comme les éosinophiles.

1.2.2.3.c. Phase tardive

La phase précoce est souvent suivie par une phase tardive qui se met en place dans les deux à huit heures suivant la dégranulation, et qui persiste pendant au moins un à deux jours. Cette seconde phase correspond à une réponse inflammatoire déclenchée par les médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles tels que le TNF- α , l'IL-4, l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-16 ou encore CCL3 [127].

Certains de ces médiateurs possèdent une activité chimotactique qui va favoriser le recrutement d'éosinophiles, de neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes au site de l'inflammation. Le TNF- α et l'IL-4 produits par les mastocytes favorisent une inflammation riche en neutrophiles et en éosinophiles. L'IL-5 produite par les lymphocytes Th2 et les mastocytes activent les éosinophiles. Les cellules recrutées libèrent alors des protéases qui provoquent des lésions tissulaires. Par ailleurs, la réaction est exacerbée par l'IL-4 qui active les cellules Th2, entraînant la production supplémentaire de cytokines. La réponse IgE, lorsqu'elle a été déclenchée, peut également être amplifiée par les basophiles, les mastocytes et les éosinophiles. Lorsqu'ils sont activés par l'allergène pontant des IgE fixées à leurs récepteurs Fc ϵ RI, ces granulocytes expriment le ligand CD40 à leur surface et sécrètent de l'IL-4. Ils peuvent donc, comme les Th2, induire la commutation de classe des cellules B au niveau du site de la réaction allergique et former des centres germinatifs au sein du foyer inflammatoire [128].

L'ensemble de ces réactions est un processus physiologique normal impliqué dans la lutte contre les agents pathogènes extracellulaires tels que les parasites [129;130]. Les lieux de survenue de ces réponses, les muqueuses, correspondent d'ailleurs aux sites potentiellement exposés aux parasites.

Ainsi, l'implication des IgE est cruciale dans les différentes étapes de la réaction allergique. La sensibilisation d'un individu à un aliment est donc révélée par la présence d'IgE spécifiques de cet aliment grâce à des dosages immunoanalytiques ou des tests d'immunoempreintes réalisés sur des prélèvements sanguins. La réactivité clinique est quant à elle confirmée par déclenchement de la réaction allergique après des tests cutanés ou des tests

de provocation orale simple ou en double aveugle (DBPCFC : double blind, placebo-controlled food challenge). Le principe de ces différents tests sera détaillé dans la partie II de cette introduction (paragraphe II.1).

I.3. LES ALLERGENES ALIMENTAIRES

I.3.1. Principaux allergènes alimentaires

Même si de nombreux aliments sont allergéniques, une petite partie d'entre eux est responsable de la majorité des réactions. Dans une étude portant sur la prévalence de l'allergie alimentaire dans la population française générale, Kanny et coll. ont montré que les aliments en cause étaient le plus fréquemment d'origine végétale, impliquant les fruits de la famille des Rosacées (abricot, cerise, fraise, framboise, pêche, poire, pomme, prune) (14%), les légumes de tous types incluant les Ombellifères (aneth, carotte, céleri, coriandre, fenouil, graines d'anis, graines de carvi, persil) et les légumineuses autres que l'arachide (pois, lupin, soja) (9%), les fruits ayant des réactions croisées avec le latex (avocat, kiwi, banane, châtaigne) (5%), les fruits à coque (noix, noix de Cajou, noix du Brésil, noisette, pistache, amande) (3%) [11]. Précisons que l'arachide n'appartient pas à la famille des fruits à coque, mais que c'est une légumineuse de la famille des Papilionacées comme les pois, les lentilles, le soja ou le lupin. Dans cette étude 1% des allergies impliquait spécifiquement l'arachide. Les allergènes alimentaires d'origine animale impliqués étaient le lait (8%), les crustacées (8%), les coquillages (7%) et l'œuf (4%). Dans une autre étude sur la population toulousaine pédiatrique (0 à 15 ans), Rancé et coll. ont observé que 5 allergènes étaient à l'origine de 78% des allergies alimentaires : l'œuf (36%), l'arachide (24%), le lait de vache (8%), la moutarde (6%) et le poisson (4%). Des variations sont cependant observées en fonction de l'âge considéré : après l'âge de 3 ans, l'arachide est l'aliment le plus fréquemment en cause, tandis que les allergies à l'œuf et au lait diminuent en fréquence [32]. Des données plus récentes de la prévalence de l'allergie en France ont été fournies par le CICBAA en 2005 [22]. Parmi les 886 observations recensées chez les enfants, les aliments le plus souvent en cause sont l'œuf (51 %), l'arachide (40 %) et le lait de vache (16 %) ; et parmi les 247 observations observées chez l'adulte, les aliments en causes sont les fruits de la famille des Rosacées (27%), les fruits ayant des réactions croisées avec le latex (23%), les Ombellifères (17,5%), les fruits à coque

(16%), les céréales (14,4%) et l'arachide (10%) (figure 10). Au Royaume-Uni, une étude récente menée sur l'Île de Wight a montré qu'à un an les aliments incriminés sont majoritairement le lait, l'œuf et dans une moindre mesure, le blé. A 3 ans, ce sont dans l'ordre, l'arachide, l'œuf, le sésame et le lait [10]. Aux Etats-Unis, Sampson rapporte que les principaux aliments allergènes sont également le lait, l'œuf et l'arachide chez le jeune enfant et les crustacées, l'arachide, les noix et le poisson chez les adultes [131].

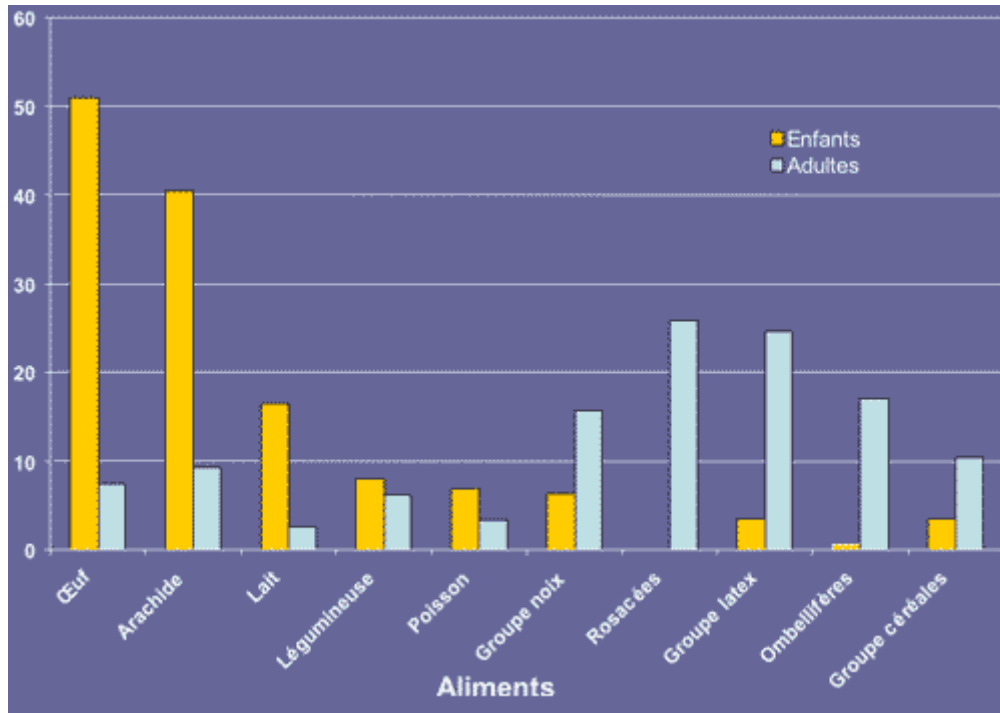


Figure 10 : Fréquence des allergies alimentaires à 10 catégories d'aliments chez l'enfant et chez l'adulte
(données du CICBAA, février 2005 [22]).

Il apparaît également que la répartition des aliments responsables d'allergie alimentaire évolue de la naissance à l'adolescence: l'allergie alimentaire aux allergènes végétaux progresse avec l'âge, tandis que le phénomène est inverse pour les réactivités aux allergènes d'animaux. Outre l'impact de la génétique et de l'environnement, des différences sont également notées en fonction des pays résultant de différences dans les niveaux et modes de consommation de certains aliments. A titre d'exemple, l'arachide consommée grillée dans les pays occidentaux est un allergène important alors qu'en Asie, l'arachide consommée bouillie est rarement impliquée dans les cas d'allergies alimentaires [132].

De plus, ces dernières années, on observe une modification du paysage allergénique conjointement à l'apparition de nouvelles allergies alimentaires. Les aliments allergéniques

émergents sont multiples : lait de chèvre ou de brebis sans allergie au lait de vache [36], sésame, lupin, isolats de blé ou encore épices, condiments ou fruits exotiques (kiwi, avocat, litchis, noix exotiques) [133]. Ces nouvelles allergies pourraient être le résultat de la modification des comportements alimentaires dans nos sociétés associée à la disponibilité croissante d'aliments « exotiques », et du développement des nouvelles technologies agroalimentaires.

Alors qu'il y a encore quelques années, la majorité des patients allergiques l'étaient à un seul aliment, actuellement une tendance à la polysensibilisation se révèle. Dans des études réalisées à la fin des années 1990, seulement 33% d'une population d'enfants [32] et 42% d'une population adulte [11] étaient allergiques à plus d'un aliment. Récemment, Osborne et coll. [134] ont montré qu'à l'âge de 4 et 8 ans, 51% des enfants allergiques l'étaient à au moins deux aliments.

Les aliments à l'origine des réactions allergiques mortelles sont principalement l'arachide et les noix. Aux Etats-Unis, l'analyse de 32 décès de patients allergiques, recensés entre 1994 et 1999, implique l'arachide dans 20 cas et les noix dans 10 cas. Le poisson et le lait sont mis en cause dans un cas chacun [135]. L'analyse de 31 nouveaux cas de réactions anaphylactiques mortelles sur une période plus récente (2001-2006) a confirmé l'importance de l'arachide et des noix (17 et 8 cas respectivement), mais a également montré une augmentation de l'implication d'autres aliments comme le lait (4 cas) et la crevette (2 cas) [136].

Les travaux réalisés durant ma thèse ont porté sur trois sources allergéniques, l'arachide, le lait de vache et la noisette, dont nous allons analyser plus précisément les caractéristiques.

I.3.2. L'allergie à l'arachide

I.3.2.1. Prévalence et caractéristiques cliniques

I.3.2.1.a. Prévalence et histoire naturelle

L'arachide est donc une source allergénique majeure. Une méta-analyse publiée en 2007 par Rona et coll. a évalué que l'allergie déclarée à l'arachide, c'est-à-dire la part de la population pensant être allergique à l'arachide, était en moyenne de 0,75% de la population générale (entre 0 et 2%) et que la fréquence de la sensibilisation à l'arachide était de 0,8%

(présence d'IgE spécifiques chez 0,5 à 2,5%) [7]. Osterballe et coll. ont montré que la fréquence de l'allergie alimentaire à l'arachide au Danemark, prouvée par DBPCFC, était de 0,2% chez des enfants de 3 ans et 0,4% chez les adultes [137]. Rappelons de plus que la prévalence de l'allergie à l'arachide a fortement augmenté ces dernières années dans différents pays [23;24].

L'allergie à l'arachide apparaît généralement pendant l'enfance, avant l'âge d'un an dans 46% des cas et avant 15 ans dans 93% des cas [35]. C'est l'exemple type de l'allergie persistante, même si une résolution survient chez certains enfants. Certaines études indiquent en effet que 15 à 20 % des allergies à l'arachide évoluent naturellement vers la guérison [17;18]. Cette acquisition de tolérance semble plus prononcée lorsque les enfants allergiques à l'arachide ont des taux d'IgE spécifiques faibles (inférieurs à 2 UI/mL), ou des taux d'IgE spécifiques qui diminuent vers l'âge de 3 ans [138;139]. A l'inverse, les enfants polysensibilisés sont moins susceptibles de guérir de leur allergie à l'arachide [140]. De plus, les patients qui sont devenus tolérants à l'arachide présente un risque de rechute important, principalement si une éviction à l'arachide est poursuivie [141].

1.3.2.1.b. Tableau clinique

Le tableau clinique de l'allergie alimentaire à l'arachide a été décrit pour la population française par Moneret-Vautrin et coll. à partir de 142 observations [35]. Les symptômes se répartissaient de la façon suivante : 40% de dermatite atopique, 37% d'angio-oedème, 14% d'asthme, 6% de choc anaphylactique et 1,4% de symptômes digestifs. L'étude de Rancé et coll., portant sur 192 enfants allergiques à l'arachide met en évidence un tableau clinique assez proche avec 46% de dermatite atopique, 32% d'urticaire ou d'angio-œdème, 15% d'asthme, 5% de choc anaphylactique, 2% de symptômes gastro-intestinaux et 0,5% de syndrome oral [32].

Il apparaît néanmoins que les manifestations cliniques sont généralement plus sévères dans les cas d'allergies alimentaires à l'arachide que pour les autres aliments. Le et coll. ont ainsi montré que les symptômes étaient plus intenses chez les patients allergiques à l'arachide comparés aux patients allergiques aux fruits [142]. D'après les données du CICBAA [22], l'arachide est responsable de 23% des urgences allergiques pédiatriques. L'arachide est également responsable de la majorité des cas des réactions anaphylactiques mortelles aux Etats-Unis [135;136].

I.3.2.1.c. Dose réactogène

Une des difficultés de l'allergie à l'arachide est de respecter une stricte éviction de cet aliment. En effet, les produits alimentaires contiennent souvent de l'arachide comme agent texturant ou de saveur, ou suite à des contaminations sur les chaînes de production. Le problème est accru par le potentiel allergénique de l'arachide. Les doses réactogènes, c'est-à-dire la quantité de protéines d'arachide qui va provoquer une réaction allergique, peuvent être très faibles. La moindre contamination croisée peut donc être dangereuse pour le patient allergique [143]. Les doses réactogènes sont plus faibles pour l'arachide que pour d'autres aliments. A titre d'exemple 87,5% des patients allergiques à l'arachide réagissent à des doses inférieures à 1g de protéine (correspondant à moins d'une cacahuète), tandis que ce pourcentage est de seulement 60% pour la même dose de protéines dans le cas de l'allergie à l'œuf [35]. Les doses d'aliments ayant déclenché une réaction allergique chez des patients allergiques à l'arachide, aux noix ou aux fruits ont été comparées : 1/3 des patients allergiques aux fruits déclare avoir mangé une quantité d'aliment inférieure à une cuillère à café, tandis que cette proportion passe à environ 2/3 dans le cas des allergiques aux noix et à l'arachide [142]. Le cas du « baiser mortel », c'est-à-dire d'allergie induite par un baiser avec un partenaire ayant consommé de l'arachide, est suffisamment évocateur pour souligner la réactivité de l'arachide à de faibles doses [144;145].

Bien que 100 µg de protéines d'arachide puissent provoquer des symptômes [146-148], il existe une grande variabilité inter-individuelle de la dose réactogène au sein de la population de patients allergiques à l'arachide. Dans ces études, certains patients ne répondaient qu'à des doses supérieures au gramme. Peeters et coll. ont déterminé que 10 µg de farine d'arachide est la dose-seuil au-dessous de laquelle aucun symptôme n'est observé dans une population d'allergiques à l'arachide [147]. Il y a cependant de grandes disparités selon les études. A titre d'exemple, Flinterman et coll. ont déterminé cette limite à 1 mg de farine d'arachide (correspondant à 2 mg d'arachide) [143]. Par ailleurs, Bindslev-Jensen et coll. ont évalué une dose-seuil de seulement 0,7 µg de farine d'arachide comme étant la dose qui entraînerait un risque de réaction allergique chez une personne sur 1 million de personnes sensibilisées à l'arachide [149].

Il est à noter que dans la plupart des études, les doses réactogènes ne sont déterminées que lors de tests de provocation DBPCFC réalisés à des fins de diagnostic. Les patients ayant une allergie très sévère ou très fortement sensibilisés ne rentrent donc pas dans ces études. Chez ces patients, les doses réactogènes sont certainement beaucoup plus faibles [148].

I.3.2.1.d. Allergies croisées

Les réactions allergiques à l'arachide et aux noix coexistent chez 20% à 50% des patients allergiques à l'arachide [24;35;150;151]. Par contre, la coexistence de l'allergie à l'arachide avec une allergie à une autre plante de la même famille comme le soja ou le pois est moins fréquente [35]. La coexistence de ces allergies peut être due à une vraie réactivité croisée (cross-sensibilisation), mais également à l'existence d'allergies concomitantes chez des individus très atopiques (co-sensibilisation). Alors que chez l'allergique à l'arachide, la sensibilisation au soja est de 6 à 53%, des manifestations cliniques ne sont observées que chez 2,3 à 11% des enfants sensibilisés [151;152]. Ces réactivités ne sont pas pour autant à sous-estimer puisqu'il existe un réel danger d'accidents suite à l'ingestion de soja chez l'allergique à l'arachide. Ce danger a été souligné dès 1999 par Foucard et Yman qui relèvent 4 accidents mortels causés par le soja chez des patients qui avaient une allergie connue à l'arachide, mais qui n'avaient jamais présenté de réaction antérieure avec le soja [153]. Il existe également une réactivité croisée entre l'arachide et le lupin [154]. Une étude a démontré une réaction croisée cliniquement significative entre les pois et l'arachide. Elle résulterait d'une sensibilisation aux homologues de la viciline dans ces aliments [155]. Les homologues entre les protéines d'arachide et d'autres plantes peuvent en effet être responsables des réactions croisées observées. On retrouve par exemple des épitopes de protéines de l'arachide dans d'autres protéines issues de plantes telles que l'amande et la noix du Brésil [156], le soja [157] ou encore la moutarde [158].

I.3.2.2. Les allergènes de l'arachide

I.3.2.2.a. Les protéines d'arachide

L'arachide (*Arachis hypogaea*) est une plante légumineuse de la famille des Papilionacées, comme les pois, les lentilles, le lupin, le soja, les fèves ou encore les haricots. La graine d'arachide, appelée cacahuète, est composée de 24 à 29% de protéines. Les premières études sur l'arachide avaient permis de décrire deux protéines majeures, l'arachine et la conarachine. L'arachine se présente sous forme d'un complexe protéique de masse moléculaire égale à 170 kDa. Elle existe sous 2 formes polymorphiques A et B qui peuvent être dissociées en sous-unités de masses moléculaires s'étalant entre 20 et 71 kDa [159]. La conarachine peut être séparée en 2 constituants, I et II, de masses moléculaires respectives 142 et 295 kDa [160]. Nous retrouvons en fait majoritairement des protéines de réserve

appartenant aux deux grandes familles des globulines 7S et 11S (viciline et glycinine) et des albumines 2S (conglutine). Outre ces protéines quantitativement majeures, l'arachide possède plus de 30 protéines différentes. L'électrophorèse bidimensionnelle de l'arachide illustre bien cette chimie protéique complexe (figure 11).

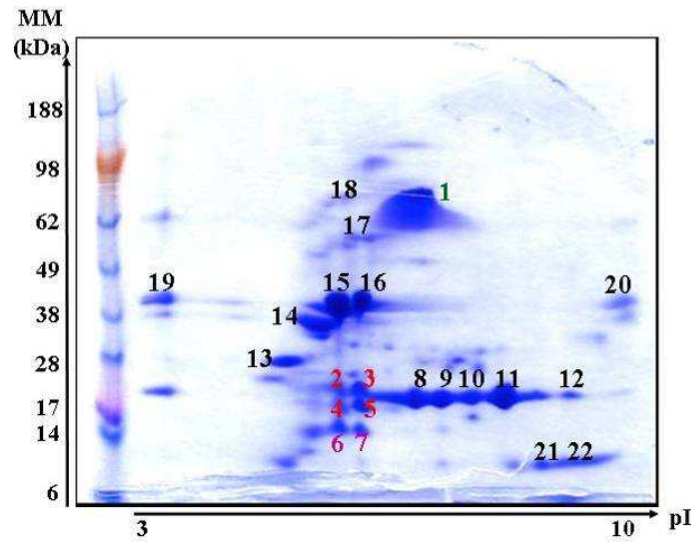


Figure 11 : Electrophorèse bidimensionnelle de l'arachide et identification des protéines
 (n°1 : Ara h 1, n°2-5 : Ara h 2, n°6-7 : Ara h 6, n°8-22 : fragments de glycinines
 (Ara h 3/4) ; MM : masse moléculaire ; pI : point isoélectrique)
 (d'après Mondoulet, 2005 [161]).

I.3.2.2.b. Les allergènes identifiés de l'arachide

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses protéines de l'arachide ont été caractérisées et identifiées comme étant des allergènes de l'arachide, c'est-à-dire reconnues par les IgE de patients allergiques à l'arachide. Les allergènes d'un aliment sont classifiés en deux groupes selon leur fréquence de reconnaissance par les IgE d'une population de patients allergiques à cet aliment. Un allergène est décrit comme majeur lorsque plus de 50% des patients allergiques à la source alimentaire en cause possèdent des IgE spécifiques de cet allergène. En dessous de cette fréquence, on parle d'allergène mineur. A ce jour, de très nombreux allergènes ont été détectés dans la graine d'arachide. L'IUIS (International Union of Immunological Societies) répertorie 11 allergènes, nommés de « Ara h 1 » à « Ara h 11 » d'après la nomenclature (« Ara » pour *Arachis*, « h » pour *hypogaea*, et le nombre indique l'ordre de découverte) (tableau 3). L'ensemble des allergènes décrits représente plus de 75% des protéines de l'arachide.

Tableau 3 : Caractéristiques des allergènes de l'arachide

Allergènes	Superfamilles	Familles		MM (kDa)		pHi	Proportion par rapport aux protéines totales (%) (3)
				données par l'IUIS (1)	obtenues au laboratoire (2)		
Ara h 1	cupines	globuline 7S	viciline	64	62,7	4,55	14 (12-16)
Ara h 2	prolamines	albumine 2S	conglutine	17	doublet à 16,67 et 18,05	5,2	6,5 (5,9-9,3)
Ara h 3	cupines	globuline 11S	glycinine	60		5,5	50
Ara h 4	cupines	globuline 11S	glycinine	37			
Ara h 5	profilines			15			
Ara h 6	prolamines	albumine 2S	homologue de la conglutine	15	14,84		4,5
Ara h 7	prolamines	albumine 2S	homologue de la conglutine	15			
Ara h 8	protéines de défense végétale	homologue de Bet v 1	Pathogenesis-related protein (PR)-10	17			
Ara h 9	prolamines	protéine de transfert des lipides non spécifique (nsLTP)		9,8			
Ara h 10		oléosine		16			
Ara h 11		oléosine		14			

(1) : d'après l'IUIS (www.allergen.org)

(2) : d'après Chatel et coll., 2003 [162] et Bernard et coll., 2007 [163]

(3) : d'après Koppelman et coll., 2001 [164] et van Wijk et coll., 2004 [165].

La caractérisation des allergènes de l'arachide a été initiée par Sachs et coll. en 1981 [166]. Cette équipe a démontré les propriétés allergéniques d'une protéine, « Peanut I », complexe de 180 kDa à l'état natif, et présentant 2 sous-unités de 20 et 30 kDa par technique électrophorétique en conditions réductrices. En 1983, Barnett et coll. démontrent le potentiel allergénique de l'arachine, de la conarachine et d'une glycoprotéine réactive à la concanavaline A (Con A) [167]. Par la suite, Burks et coll. mettent en évidence une fraction immunoréactive qui possède un poids moléculaire de 63 kDa et un pHi de 4,5 [168]. Cette protéine s'est avérée être identique à la glycoprotéine réactive à la Con A décrite par Barnett. L'allergène ainsi identifié, nommé Ara h 1, appartient à la famille des globulines 7S (viciline). Les études d'immunoréactivité avec des sérums de patients allergiques ont montré qu'Ara h 1 est un allergène majeur de l'arachide : près de 90% des sérums de patients allergiques possèdent des IgE spécifiques de cette protéine [168-170].

En 1992, Burks et coll. ont isolé et caractérisé un autre allergène de l'arachide, appelé Ara h 2 [171]. Ara h 2 appartient à la famille des albumines 2S (conglutines), et se présente en électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme un doublet à 16,67 et 18,05 kDa [172]. Ces doublets correspondent à deux isoformes qui se distinguent par la présence/absence d'une

séquence de 12 acides aminés. Ara h 2 est reconnue par les IgE de plus de 80% de patients allergiques à l'arachide [169;171;173;174], ce qui fait de cette protéine un autre allergène majeur de l'arachide. Récemment, Ara h 6, une autre albumine 2S, a également été décrite comme étant un allergène majeur reconnu par 80 à 95 % des patients allergiques [163;173;175]. Il a été montré par Bernard et coll. que Ara h 6 présente naturellement un polymorphisme dans la graine d'arachide. Une isoforme de Ara h 6 a été caractérisée ainsi qu'un de ses produits issu d'une protéolyse naturelle lors de la maturation de la graine d'arachide. Cette maturation entraîne la formation d'un hétérodimère dont la structure est maintenue par des ponts disulfures. La reconnaissance de Ara h 6 par les IgE de patients allergiques n'est pas modifiée par cette maturation naturelle, tandis qu'une perte drastique de la liaison aux IgE humaines est observée lorsque ces isoformes sont réduites chimiquement. Ces résultats suggèrent donc que l'allergénicité de Ara h 6 dépend fortement du maintien de sa conformation tridimensionnelle grâce à ses ponts disulfures [163].

Des protéines de la famille des globulines 11S (glycinines) ont également été identifiées comme allergènes de l'arachide. Ara h 3, qui a été tout d'abord identifiée par une approche de biologie moléculaire, présente une masse moléculaire de 58 kDa et un pHi de 5,5 [176]. Ara h 4, de masse moléculaire 36 kDa, est une isoforme de Ara h 3, possédant 91% d'homologie avec cette dernière [170]. Cependant les glycinines dans l'arachide n'existent pas sous une forme entière ou associée. Ara h 3/4 est naturellement présente dans la plante sous forme de polypeptides de 14 à 45 kDa, résultant d'une protéolyse naturelle au cours de la maturation de la plante [177]. Selon les études se basant sur des formes naturelles ou recombinantes, cette protéine est reconnue par 35 à 55% des IgE de sérums de patients allergiques à l'arachide [170;173;174;176].

Ara h 5 (profiline) et Ara h 7 (albumine 2S) ont également été décrits comme des allergènes mineurs de l'arachide [170]. Ara h 8, la protéine homologue à Bet v 1, l'allergène majeur du pollen de bouleau, a été récemment clonée et est reconnue par 85% des patients qui sont sensibilisés au pollen de bouleau [178]. Ara h 9, la protéine de transfert lipidique (LTP) de l'arachide a également été caractérisée récemment comme étant un allergène de l'arachide [179]. Ara h 10 et Ara h 11, protéines de la famille des oléosines, ont également été décrites comme étant des allergènes mineurs [180]. Cependant, à ce jour, les formes protéiques de ces allergènes n'ont pas été isolées dans la graine. Leur présence naturelle et leur proportion n'ont pas encore été évaluées.

La plupart des allergènes de l'arachide peuvent donc être décrits comme des allergènes majeurs suivant la définition énoncée et les données de la littérature. Ainsi, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 et Ara h 3 sont des allergènes majeurs. De plus, la sensibilisation à un seul allergène de l'arachide est relativement rare. On observe le plus souvent une co-sensibilisation à pratiquement tous ces allergènes [161]. De nombreux épitopes ont été identifiés sur ces protéines, les IgE des patients allergiques en reconnaissant souvent plusieurs d'un même allergène [181-183]. Cependant, la comparaison de la réactivité de ces allergènes purifiés semble établir un classement suivant leur potentiel allergénique. Dans ces études, la réactivité est évaluée *in vitro* par la capacité de liaison aux IgE de patients allergiques [163;173;174] et dans des tests de dégranulation de cellules effectrices [174;184], et *in vivo*, par des tests cutanés chez des patients allergiques [147;163;173;174]. La majorité des études fait ressortir le fort potentiel allergénique des albumines 2S en dépit de leur faible quantité dans la graine d'arachide (tableau 3).

Les albumines 2S de l'arachide (Ara h 2, Ara h 6) sont des protéines résistantes à la digestion et aux traitements thermiques. Il a été mis en évidence un noyau central résistant à la digestion par la trypsine et la chymotrypsine, ainsi qu'aux traitements thermiques, et qui possède la même capacité à déclencher la réaction allergique que les protéines intactes [185]. A l'inverse, la digestion gastroduodénale *in vitro* de Ara h 1 conduit à une dégradation très rapide de cette protéine. Cependant, il apparaît que les produits de cette digestion sont capables de se lier aux IgE anti-Ara h 1, de stimuler la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique et de provoquer une libération d'histamine par les basophiles de patients allergiques aussi efficacement que Ara h 1 intacte [186]. Des travaux complémentaires ont démontré que certains peptides issus de la digestion gastrique de Ara h 1 s'organisent en agrégats constitués par l'assemblage de deux à quatre polypeptides de MM d'environ 8 et 11 kDa. La formation de tels agrégats serait responsable de la préservation du pouvoir déclenchant des digestats de Ara h 1 malgré la disparition de la protéine [187].

I.3.3. L'allergie au lait de vache

L'allergie alimentaire au lait de vache est à distinguer des intolérances au lait ou au lactose, qui correspondent à des manifestations non immunologiques liées à un déficit enzymatique en lactase.

I.3.3.1. Prévalence et caractéristiques cliniques

I.3.3.1.a. Prévalence et histoire naturelle

L'allergie au lait de vache est une allergie très importante, surtout chez les nourrissons pour qui le lait constitue la source alimentaire unique puis majeure. Dans la population générale, la prévalence de l'allergie au lait de vache a été évaluée par Rona et coll. dans une méta-analyse publiée en 2007 [7]. La prévalence de l'allergie déclarée au lait de vache, c'est-à-dire la part de la population pensant être allergique au lait de vache est de 3,5% (1,2 à 17%). Cependant, la prévalence réelle de l'allergie au lait de vache, diagnostiquée par test de provocation, est de 0,9% (entre 0 et 3%). Une analyse en fonction de l'âge montre que la prévalence de l'allergie alimentaire au lait de vache diagnostiquée par DBPCFC est de 0,6% chez les enfants de 3 ans et de 0,3% chez les adultes [137].

L'allergie au lait de vache est généralement contractée dans les premiers mois de la vie, et son évolution naturelle semblait être une rémission avec l'âge, d'où une prévalence plus faible chez l'adulte. Ainsi, à presque 9 ans, 15% des enfants seulement présentaient une allergie persistante au lait de vache [12]. Une autre étude analysant le statut, à l'âge de 10 ans, d'enfants ayant eu une allergie au lait de vache, a montré que 93% de ces enfants étaient devenus tolérants, du moins à des faibles doses de protéines de lait. Cependant, 45% des sujets développaient des réactions gastro-intestinales à des doses plus fortes de lait [188]. Des études plus récentes suggèrent néanmoins que l'acquisition de la tolérance a tendance à diminuer et qu'elle survient de plus en plus tardivement. Levy et coll. ont en effet constaté que plus de la moitié des enfants avec une allergie au lait ne guérissent pas de leur allergie avant l'âge de 3 ans [189]. Les taux de résolution de l'allergie au lait de vache ont été seulement de 42% à 8 ans et de 79 % à 16 ans dans l'étude de Skripak et coll. [13].

Enfin, une allergie au lait durant l'enfance entraîne des risques plus élevés de développer des maladies respiratoires atopiques, d'avoir une dermatite atopique persistante ou encore des otites récurrentes [188].

I.3.3.1.b. Tableau clinique

Les manifestations cliniques de l'allergie au lait de vache sont principalement cutanées ou gastro-intestinales. Une classification des manifestations selon l'organe impliqué démontre des atteintes cutanées dans 85% des cas, du système gastro-intestinal dans 46%, du système respiratoire inférieur dans 14%, et supérieur dans 6% des cas [13]. Un tableau

clinique plus précis de l'allergie au lait de vache chez les enfants implique 50% de dermatite atopique, 26% d'urticaire et d'angio-œdème, 7% de choc anaphylactique, 7% de symptômes gastro-intestinaux, 6% d'asthme et 3% de rhino-conjonctivite [32]. Les symptômes de l'allergie alimentaire au lait de vache chez l'adulte sont plus sévères. Lam et coll. ont par exemple observé 67% de symptômes sévères, notamment des symptômes pulmonaires et cardio-vasculaires, dans leur population d'adultes allergiques au lait de vache [190]. De plus, les patients ont un seul organe affecté dans 50% des cas, 2 organes pour 35% et 3 organes ou plus pour 12% [13].

Notons enfin que les patients présentant une allergie au lait de vache ont, dans 91% des cas, une autre allergie alimentaire. Une allergie concomitante à l'œuf ou à l'arachide sont les plus fréquemment rencontrées, viennent ensuite les allergies alimentaires aux noix, soja, farine, crustacés, sésame, bœuf, et poisson [13].

I.3.3.1.c. Dose réactogène

La plus petite dose de lait de vache initiatrice de réactions allergiques a été estimée lors de tests de provocation à 0,02 ml, correspondant à 0,6 mg de protéines [191]. D'autres études par DBPCFC relèvent des doses déclenchantes de 0,3 mg à 300 mg de protéines [190;192].

I.3.3.1.d. Réactions croisées

Les réactions croisées les plus fortes sont observées entre le lait de vache et les laits de chèvre et de brebis. D'autres moins significatives existent avec le lait humain et les protéines de viande de bœuf. Les protéines du lait sont en effet très conservées entre les laits de différentes espèces et notamment des ruminants. A titre d'exemple, les protéines des laits de chèvre et de brebis partagent 87 à 96% d'homologies de séquences avec les protéines du lait de vache [193]. Cette réaction croisée a été confirmée cliniquement par des tests DBPCFC, réalisés avec du lait de chèvre chez des enfants allergiques au lait de vache, et qui se sont avérés positifs dans 92% des cas [194]. A l'inverse, il existe une population d'allergiques au lait de chèvre et de brebis qui tolèrent le lait de vache [36;195-197]. Il a également été démontré qu'il y avait une réactivité croisée entre les protéines bovines et celles du lait maternel (épitopes communs entre la caséine β humaine la caséine β bovine [198] et entre l' α -lactalbumine bovine et humaine [199]). Enfin, il peut y avoir des réactions croisées entre la sérum albumine bovine présente dans la viande et le lait [200].

I.3.3.2. Les allergènes du lait de vache

I.3.3.2.a. Les protéines du lait de vache

Le lait de vache a un taux protéique de 30 à 35 g/L et contient plus de 25 protéines différentes. Ces protéines sont classées en deux groupes suivant qu'elles précipitent ou non à pH 4,6 ou sous l'action de présure : le lait coagulé (ou lait caillé) qui représente 80% des protéines totales est constitué des caséines, et le lactosérum (ou petit lait), fraction soluble représentant les 20% restants. Les principales caractéristiques des protéines du lait de vache sont données dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principales caractéristiques des protéines du lait de vache

Protéines (30-35 g/L)	Nom de l'allergène	Concentration (g/L)	MM (kDa)	Nombre de résidus acides aminés	Nombre de ponts S-S par mole	Structure secondaire		pHi
						Hélice α	feuillet β	
						(% de la chaîne)		
Lactosérum		5						
β -lactoglobuline	Bos d 5	3-4	18,3	162	2 + 1 SH libre	+++	15	5,3
α -lactalbumine	Bos d 4	1-1,5	14,2	123	4	++	25	4,8
Immunoglobulines	Bos d 7	0,6-1						
Sérum albumine	Bos d 6	0,1-0,4	66,3	582	17 + 1 SH libre	+++	50	4,9-5,1
Protéose-peptone		0,5-1,5						
Lactoferrine		0,09	80	703	16			8,7
Caséines	Bos d 8	30						
α s1		12-15	23,6	199		+	4-15	4,9-5
α s2		3-4	25,2	207				5,2-5,4
β		9-11	24	209		+	1-10	5,1-5,4
κ		3-4	19	169		++	14	5,4-5,6

(d'après Wal et coll., 1998 et 2001 [193;201]).

Le lactosérum contient essentiellement des protéines globulaires, c'est-à-dire des protéines sphériques compactes solubles dans l'eau. Les protéines majeures du lactosérum sont la β -lactoglobuline bovine (β LG) et l' α -lactalbumine (α -lac), protéines directement synthétisées dans la glande mammaire. D'autres protéines provenant du sang sont également présentes dans le lactosérum : sérum albumine bovine (SAB), immunoglobulines et traces de lactoferrine.

La β LG, qui n'a pas d'homologue dans le lait de la femme, appartient à la superfamille des lipocalines, protéines qui lient et transportent des ligands hydrophobes. La

β LG se présente naturellement sous forme d'un dimère de 36 kDa entre pH 3 et 7. Chaque sous-unité correspond à un polypeptide de 162 acides aminés (MM 18,3 kDa). La molécule possède deux ponts disulfures intra-moléculaires et un groupement thiol libre (-SH). La structure tertiaire de la β LG a été déterminée par Papiz et coll. en 1986 [202] : elle est constituée de 3 hélices- α et de 9 feuillets- β anti-parallèles. Les feuillets- β forment une cavité centrale hydrophobe, le calice, qui constitue le site de liaison des ligands hydrophobes, notamment le rétinol (retinol binding protein) [202;203]. Le groupement thiol libre a une activité pH dépendante et serait indispensable au maintien de la structure tridimensionnelle de la β LG et à la stabilité des dimères de β LG [204]. La digestion de la β LG se fait dans l'intestin par la trypsine et la chymotrypsine puisque cette protéine est résistante à la pepsine et au pH gastrique. Il existe de nombreux variants de la β LG. Les deux principaux sont les variants A et B, qui se différencient seulement par deux mutations sur les résidus en positions 64 et 118.

L' α -lactalbumine est une protéine globulaire monomérique de 123 résidus acides aminés (MM 14,2 kDa) comportant quatre ponts disulfures. Elle fait partie du système enzymatique de régulation de la galactosyl transférase responsable de la synthèse du lactose. L' α -lac possède un site de liaison de haute affinité pour le calcium et cette liaison stabilise sa structure secondaire. L' α -lac bovine présente de fortes homologues de séquence et de structure avec le lysozyme du blanc d'œuf de poule, mais aussi avec l' α -lac humaine.

La fraction caséine entière comporte quatre protéines différentes : les caséines α 1, α 2, β , et κ qui représentent respectivement 32%, 10%, 28% et 10% des protéines totales du lait. En dépit de leurs noms et de leur origine commune, ces protéines montrent peu d'homologie dans leurs séquences en acides aminés. La masse moléculaire de ces 4 protéines est respectivement 23,6 kDa, 25,2 kDa, 24 kDa et 19 kDa. Les caséines se lient entre elles pour former des agrégats (micelles) en suspension dans le lactosérum. Dans les micelles, la proportion des différentes caséines par rapport au contenu total en caséines est relativement constante : 37% de caséines α 1 et α 2 et 13% de caséines β et κ . Ces micelles comprennent une partie centrale hydrophobe et une couche périphérique hydrophile où le fragment polaire C-terminal de la caséine κ est exposé. Les domaines polaires des autres caséines, pouvant lier le calcium (caséines α 1, α 2 et β), contiennent notamment des sites majeurs de phosphorylation qui sont également présentés à la surface des micelles. Les caséines ne sont

pas affectées de manière significative par les traitements thermiques sévères mais sont très sensibles aux protéases et exopeptidases.

Les protéines du lait de vache sont très hétérogènes, elles ont très peu de structures ou de fonctions en commun. Cette hétérogénéité est renforcée par leur polymorphisme génétique, puisqu'il existe en effet de nombreux variants de chaque protéine. Ces variants sont caractérisés par des substitutions ponctuelles d'acides aminés, des délétions de fragments peptidiques de taille variable. L'hétérogénéité se caractérise également par l'existence de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation). La caséine α_2 bovine existe ainsi sous 4 niveaux de phosphorylation différents.

I.3.3.2.b. Les allergènes identifiés dans le lait de vache

Différentes études ont porté sur l'analyse de la reconnaissance des protéines du lait par les IgE de larges populations de patients allergiques au lait. Wal et coll. ont ainsi étudié la fréquence de reconnaissance des différentes protéines du lait de vache par les IgE de 92 patients allergiques au lait de vache [205]. Cette étude montre que seulement 25% des patients sont mono-sensibilisés, c'est-à-dire possèdent des IgE dirigées contre une seule protéine, avec reconnaissance dans 30% des cas de la β LG, dans 28% de la SAB et dans 25% de la fraction caséine. Respectivement, 15, 20, 18 et 14% des patients sont sensibilisés à 2, 3, 4 ou 5 allergènes différents du lait de vache. Il apparaît que ce sont les protéines les plus représentées au sein du lait de vache qui sont les plus fréquemment reconnues par les IgE de patients : la fraction caséine (Bos d 8) (reconnue par 65% des IgE de patients allergiques), la β LG (Bos d 5) (61%) et l' α -lac (Bos d 4) (51%). Mais des protéines du lait plus minoritaires comme la SAB (Bos d 6) ou la lactoferrine, sont également reconnues respectivement par 43% et 35% des patients. Bernard et coll. ont étudié les intensités de la reconnaissance par les IgE spécifiques des différentes caséines dans une population de 58 patients allergiques au lait de vache sensibilisés à la fraction caséine entière [206]. Les intensités de réponses des IgE spécifiques des différentes caséines varient fortement en fonction des sérums et des caséines, mais 85% des patients présentent des IgE dirigées contre chacune des 4 caséines. Les titres en IgE spécifiques sont plus élevés contre les caséines les plus abondantes, c'est-à-dire la caséine α_1 et la caséine β . Shek et coll. ont plus récemment conduit une étude sur une population de 113 patients ayant une allergie au lait de vache médiée par les IgE [207]. Les fréquences de reconnaissance des différentes protéines du lait par les IgE sont de 65% pour la caséine α_2 ,

75% pour la caséine β , 48% pour la caséine κ , 36% pour la β LG et 36% pour l' α -lac. De plus, les taux d'IgE spécifiques sont plus élevés pour les caséines α s et β que pour les protéines du lactosérum, soulignant l'importance que prennent les caséines dans l'allergie au lait de vache. En effet, on observe actuellement une augmentation des fréquences et intensité de reconnaissance des caséines par les IgE de patients allergiques au lait, conjointement à une diminution de l'implication des protéines du lactosérum [193].

L'étude fine de la spécificité des IgE aux protéines du lait a permis d'identifier des épitopes séquentiels comme conformationnels sur ces différentes protéines [208-214]. L'ensemble de ces publications démontre la multitude des épitopes reconnus au sein des protéines du lait de vache, et particulièrement des caséines. Le profil de reconnaissance des épitopes sur les différentes protéines du lait pourrait être un marqueur du fait que le patient va conserver son allergie au lait ou au contraire acquérir une tolérance. Des travaux suggèrent en effet que les enfants ayant une allergie persistante reconnaissent préférentiellement des épitopes linéaires. A l'inverse, l'acquisition d'une tolérance serait liée à la reconnaissance d'épitopes conformationnels [215;216].

I.3.4. L'allergie à la noisette

I.3.4.1. Prévalence et caractéristiques cliniques

I.3.4.1.a. Prévalence

Peu d'études portent sur la prévalence de l'allergie à la noisette. Sa prévalence est souvent exprimée pour le « groupe des noix » ou le « groupe des fruits à coque » avec la noix, la noix de cajou, la noix du brésil, l'amande, la pistache ou le pignon de pin. Chez les enfants, le « groupe des noix » représente 6,3% des observations d'allergies alimentaires (au 6^{ème} rang), tandis que les fruits à coque représentent 16% des observations chez les adultes (au 4^{ème} rang) (données du CICBAA) [22]. En France, malgré son rang important, l'allergie à la noisette touche seulement 2,7% des enfants allergiques [32]. Aux Etats-Unis, 0,4% de la population générale serait atteinte, cette prévalence étant stable sur 5 ans [24].

La noisette est un allergène qui peut être « vrai » ou « incomplet ». Un allergène est dit vrai quand il est à la fois capable de sensibiliser un individu et de déclencher la réaction allergique. Un allergène est dit incomplet, ou secondaire, quand il est capable de déclencher une réaction allergique chez des individus déjà sensibilisés mais pas de sensibiliser

l'organisme *de novo*. Une grande partie des cas d'allergie à la noisette résulte d'une réaction croisée avec un allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1, qui est l'allergène sensibilisant. L'allergie alimentaire à la noisette est alors déclenchée uniquement chez les patients présentant une pollinose au bouleau. La prévalence de l'allergie à la noisette est plus forte chez ces individus, atteignant 6% [137]. Des tests cutanés démontrent une sensibilisation à la noisette chez 18% de la population adulte allemande. La sensibilisation à la noisette est alors souvent associée à d'autres allergies alimentaires (céleri dans 66% des cas ou arachide dans 51% des cas) ou à la pollinose au bouleau (94% des cas) [217]. Mais la noisette peut également être à l'origine de « vraies » réactions allergiques, sensibilisant l'individu atopique par voie digestive. Nous verrons que les allergènes impliqués dans les allergies vraies et secondaires sont différents.

I.3.4.1.b. Tableau clinique

Les réactions secondaires chez les patients sensibilisés au pollen de bouleau induisent le plus souvent des symptômes légers localisés au niveau de la bouche (le syndrome oral d'allergie) [218]. Chez les patients ayant une allergie à la noisette sans allergie au pollen concomitante, les symptômes tendent à être plus sévères et souvent systémiques (urticaire, angio-œdème, anaphylaxie, anaphylaxie induite par l'effort) [219;220]. Les réactions allergiques à la noisette sont globalement plus sévères que celles observées pour les fruits, mais moins que pour l'arachide [142].

I.3.4.2. Les allergènes de la noisette

La noisette est le fruit du noisetier (*Corylus avellana*), plante de la famille des Bétulacées. De nombreux allergènes recensés par l'IUIS ont été mis en évidence dans la noisette (tableau 5).

Tableau 5 : Principales protéines allergènes de la noisette.

Noms	Familles	MM (Kda)
Cor a 1	PR-10 (homologue de Bet v 1)	17
Cor a 2	Profiline	14
Cor a 8	LTP	9
Cor a 9	globuline 11S	40
Cor a 10	protéine chaperon (BiP) (luminal binding protein)	70
Cor a 11	globuline 7S	48
Cor a 12	oléosine 17 kDa	17
Cor a 13	oléosine 14-16kDa	14-16

Nous retrouvons, là encore, une variété d'allergènes issus de nombreuses familles de protéines et ayant des caractéristiques physicochimiques différentes. En 1992, Hirschwehr et coll. ont identifiés 2 allergènes de la noisette : Cor a 1, une protéine homologue de Bet v 1 de 17 kDa et Cor a 2, une profiline de 14 kDa chez des patients ayant une allergie au pollen de noisetier [218]. En 2002, Beyer et coll. ont identifié un nouvel allergène : une globuline 11S de 40 kDa appelée Cor a 9, qui est reconnue par 86% des 14 sérums de patients américains ayant des réactions systémiques sévères [221]. En 2004, Schocker et coll. ont aussi caractérisé un allergène chez des patients ayant une allergie à la noisette non liée à une sensibilisation au pollen de bouleau. Cet allergène est une LTP de 9 kDa (Cor a 8), reconnue par 62 à 77% des IgE selon la méthode utilisée [220]. Cette même année, Lauer et coll. ont identifié un nouvel allergène mineur : Cor a 11, une globuline 7S de 48 kDa. Pour cette protéine, 47% d'une population de patients suisses et allemands allergiques à la noisette avaient des IgE spécifiques de cette protéine [222]. Plus récemment, un statut d'allergène mineur a été attribué à Cor a 10, une protéine chaperon (BiP) [223] et Cor a 12 et Cor a 13, des oléosines [224].

Les profils de sensibilisation aux allergènes de noisette varient selon l'existence ou non d'une sensibilisation par le pollen de bouleau. L'exposition au pollen de bouleau variant entre les différentes régions d'Europe, l'origine géographique détermine le profil de sensibilisation des patients. Dans une étude portant sur une population de 65 patients suisses et allemands allergiques à la noisette, la prévalence de la réaction IgE était de 98% pour la protéine recombinante Cor a 1 (rCor a 1.04), 15% pour rCor a 2 et de moins de 47% pour Cor a 11. Aucune réaction n'était observée pour rCor a 8 [222]. Un profil de réactivité semblable à rCor a 1.04, Cor a 2 et Cor a 8 est observé chez 17 patients d'Europe du Nord allergiques à la noisette [225]. Par contre, en Europe du Sud, l'implication des allergènes est inversée. Dans une étude réalisée sur 26 sujets espagnols allergiques à la noisette sans allergie au pollen de

bouleau, dont 10 sujets avaient présenté un choc anaphylactique, la prévalence de réactions IgE à Cor a 8 était de 62 à 77% selon la méthode de détection utilisée. Seul un patient montrait une réaction IgE à rCor a 1.04 et aucun à Cor a 2. Les auteurs soulignent ainsi l'importance de Cor a 8 pour la majorité des patients espagnols présentant une allergie alimentaire vraie à la noisette et qui est associé à des réactions allergiques sévères [220]. D'autres études corroborent ces observations [219;226].

I.3.5. Conclusion

Toutes ces observations démontrent une très grande hétérogénéité de la réponse IgE chez les patients souffrant d'une allergie alimentaire. Ceci est dû à la variabilité génétique des individus et aux conditions environnementales, incluant la fréquence et l'âge d'exposition ou les habitudes alimentaires. La diversité allergénique dans les sources alimentaires décrites est également un facteur important. Dans un aliment, les allergènes sont multiples et éventuellement présents sous différentes isoformes, chacun de ces allergènes possédant de nombreux épitopes. Selon les patients, la forme majoritairement reconnue sera la protéine native ou au contraire dénaturée (épitopes conformationnels ou linéaires). Ainsi, bien que des familles de protéines ou des structures communes puissent être retrouvées dans différents aliments (LTP, albumines 2S...) ou au sein d'un même aliment (site majeur de phosphorylation des caséines), il est impossible d'associer l'allergénicité d'un aliment à une protéine et encore moins à une séquence ou une « structure cible définie et caractérisée ».

II. ETUDE *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE L'ALLERGENICITE DES ALIMENTS

L'évaluation de l'allergénicité d'une protéine ou d'un aliment, telle que réalisée lors de l'évaluation du risque d'allergénique lié à la consommation d'aliments dérivant d'organismes génétiquement modifiés, doit prendre en compte à la fois sa capacité à induire une réponse IgE (pouvoir sensibilisant), sa capacité à déclencher la réaction allergique chez un individu déjà sensibilisé (pouvoir déclenchant) et sa capacité à favoriser l'induction d'une réponse allergique spécifique à d'autres protéines/aliments (pouvoir adjuvant). L'étude de l'allergénicité des aliments sera ici restreinte à l'étude de l'allergénicité de protéines purifiées d'aliments et à l'effet de modifications induites par différents procédés chimiques ou physiques sur cette allergénicité.

II.1. OUTILS D'EVALUATION DE L'ALLERGENICITE

L'évaluation de l'allergénicité d'une protéine alimentaire « naturelle », ainsi que l'évaluation de l'effet des procédés (chauffage, digestion, procédé industriel, ...) sur l'allergénicité d'un aliment ou d'une protéine purifiée, utilisent différentes méthodologies:

- étude de la reconnaissance de la protéine purifiée naturelle / modifiée par les IgE de patients allergiques
- capacité de dégranulation de cellules effectrices. Ces cellules peuvent provenir de patients allergiques à l'allergène d'origine (basophiles circulants). Elles possèdent dans ce cas à leur surface des IgE spécifiques de l'allergène. Les cellules effectrices peuvent également provenir de patients non allergiques ou correspondre à des lignées cellulaires humanisées : dans ces deux cas, les cellules sont passivement sensibilisées avec les IgE de patients allergiques.
- évaluation des capacités de sensibilisation et de déclenchement de la réaction allergique (ou d'effets adjuvants) à l'aide de différents modèles animaux
- utilisation de tests de provocation chez un individu allergique à l'allergène d'origine.

Les caractéristiques de ces outils vont être développées. Nous ferons ensuite une revue de la littérature concernant l'étude de l'effet des procédés sur l'allergénicité des aliments.

II.1.1. Tests *in vitro* de la réactivité des IgE

II.1.1.1. Etude de la liaison IgE-allergène

On peut mesurer la sensibilisation d'un patient à un allergène par immunoempreinte ou par dosage des IgE sériques spécifiques.

II.1.1.1.a. Immunoempreinte

Les immunoempreintes permettent de détecter les anticorps IgE spécifique d'un extrait allergénique donné dont les fractions protéiques/peptidiques sont séparées par électrophorèse (1D ou 2D), transférées sur membrane inerte puis incubées avec le sérum du patient. Les protéines reconnues par les IgE de patients sont révélées grâce à un anticorps anti-IgE humaines marqué. Cette technique est souvent utilisée lorsque l'on ne dispose pas d'un test de dosage des IgE spécifiques des protéines à tester. Elle permet notamment de visualiser l'« allergome » du patient, c'est-à-dire de révéler différenciellement et simultanément les différentes protéines auxquels le patient est sensibilisé.

II.1.1.1.b. Dosage des IgE spécifiques

Le dosage des IgE spécifiques dans le sérum du patient est réalisé par des techniques traditionnellement dénommées « RAST » (Radio Allergo-Sorbent Test) en référence à la première technique développée [227]. L'allergène, fixé à un support solide (plaques 96 puits, puces, ...), est incubé avec le sérum à tester et les IgE spécifiques liées à cet allergène sont révélées par un anticorps anti-IgE marqué. Le marqueur radio-isotopique, initialement utilisé, est désormais remplacé par des marqueurs fluorescents ou enzymatiques (Enzyme Allergo-Sorbent Test (EAST)). Les taux d'IgE mesurés sont exprimés en unités internationales par millilitre (UI/mL) ou en kilo-unités par litre (kU/L) (1 UI ou U correspondant à 2,4 ng d'IgE). Ces dosages sont semi-quantitatifs et utilisent une gamme étalon réalisée sur une phase solide revêtue d'un anticorps anti-IgE complémentaire de l'anticorps de révélation.

La technique de dosage des IgE sériques spécifiques, reconnue comme la référence, est celle du Cap System[®] de Pharmacia dont le seuil de détection est 0,35 kU/L. En 1997, Sampson et Ho ont établi des valeurs seuils d'IgE spécifiques dirigées contre des aliments usuels, au-dessus desquelles les tests de provocation orale ont 95% de chance d'être positifs. Ces valeurs prédictives ont été calculées pour l'œuf (6 kU/L), le lait de vache (32 kU/L),

l'arachide (15 kU/L) et le poisson (20 kU/L). Pour certains aliments comme le soja et le blé, ces valeurs prédictives ne peuvent pas être calculées [228]. D'autres études reposant sur des populations et des techniques différentes rapportent des valeurs prédictives légèrement différentes [229-232].

Les résultats des EAST peuvent être influencés par un taux élevé d'IgG spécifiques de l'allergène qui peuvent conduire à une sous-estimation du taux d'IgE spécifiques par compétition pour la liaison à l'allergène immobilisé [233]. Des dosages dans un format en capture d'IgE ont été développés permettant de s'affranchir de cette interférence avec les IgG spécifiques et d'augmenter ainsi la sensibilité du test [234-236]. Le principe de ces tests est de capturer les IgE avec un anticorps anti-IgE humaines immobilisé, puis de révéler les IgE spécifiques d'un allergène à l'aide de l'allergène marqué. Au laboratoire, ce format de dosage a été employé pour détecter les IgE spécifiques des allergènes purifiés de l'arachide avec des allergènes couplés directement à une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE). Ce format de dosage est plus sensible, et permet notamment de révéler des sérums qui sont des faux-négatifs dans l'EAST classiquement utilisé [161].

Des variantes de ces tests sont les tests par inhibition qui permettent de comparer la capacité de liaison aux IgE de deux allergènes différents, mais également de mettre en évidence des réactions croisées entre différents allergènes.

Le principe des tests d'inhibition de RAST ou d'EAST réside dans la capacité de protéines en solution à inhiber la fixation des IgE spécifiques à l'allergène immobilisé. En cas d'interaction significative, une augmentation de la concentration du compétiteur inhibera progressivement puis complètement la liaison des IgE à l'allergène immobilisé. L'inhibition de référence est obtenue par incubation avec l'allergène correspondant à celui qui est immobilisé. Ce type de test a été développé dans le cadre de l'allergie au venin d'abeille [237] puis de l'allergie alimentaire à l'arachide [238]. De la même façon que pour le développement des dosages d'IgE spécifiques, les inhibitions peuvent être réalisées dans le format en capture d'IgE. Le principe réside alors dans la capacité des compétiteurs à inhiber la liaison des IgE à l'allergène marqué. Du fait de la meilleure sensibilité du dosage des IgE spécifiques dans ce format, les sérums peuvent être utilisés plus dilués, favorisant ainsi l'inhibition [161].

Il est à noter que ces tests mesurent une capacité de liaison aux IgE et évaluent donc la sensibilisation à un allergène. Le pontage des IgE liées à leur récepteur, et *in fine* l'activation

des cellules effectrices, nécessite en théorie la liaison simultanée de deux IgE à deux épitopes distincts sur le même allergène. Ces tests qui mesurent une simple liaison des IgE à une protéine ne reflètent donc pas la fonctionnalité allergénique de celle-ci.

II.1.1.2. Etude sur cellules effectrices

L'obligation d'une liaison simultanée de deux molécules IgE liées aux cellules effectrices par un allergène rend les tests cellulaires plus proches des phénomènes physiologiques de la réaction allergique.

Le principe des tests cellulaires est d'isoler les basophiles d'un patient allergique à partir d'un prélèvement sanguin, puis de les mettre en présence de l'allergène. Un marqueur de l'activation est finalement mesuré. La capacité d'un aliment à induire la dégranulation des basophiles peut être quantifiée par la mesure de libération de médiateurs tels que l'histamine [239] ou les leucotriènes [240]. L'augmentation de l'expression de marqueurs exprimés à la surface des basophiles activés comme le CD63 [241;242] ou le CD203c [243] peut également être analysée en cytométrie en flux.

Cependant, certains patients ont des basophiles qui ne dégranulent pas suite à l'activation par des allergènes [244]. De plus, l'obtention de basophiles peut s'avérer délicate lorsque l'on s'intéresse au jeune enfant allergique. Nolte et coll. préconisent alors l'utilisation de basophiles provenant de donneurs non allergiques qui seront ensuite sensibilisés passivement avec les IgE sériques de patients allergiques [245].

Outre le problème éthique lié à l'utilisation de produits sanguins humains, l'obtention de basophiles de patients allergiques ou de donneurs non allergiques reste difficile. Les basophiles représentent en effet moins de 1% des cellules sanguines, nécessitant des prélèvements de volumes importants de sang pour réaliser ces tests. De plus, les basophiles doivent être fraîchement prélevés afin d'obtenir une bonne sensibilité. Pour pallier ces problèmes pratiques et éthiques, des lignées cellulaires immortalisées peuvent être utilisées à des fins de recherche. Ces lignées cellulaires sont des cellules RBL 2H3 (mastocytes de rat) humanisées, c'est-à-dire transfectées avec le FcεRI humain. Elles peuvent donc être sensibilisées passivement avec des sérums de patients allergiques puis activées par les allergènes. Le maintien et la multiplication de ces cellules en culture sont relativement aisés. Ces lignées cellulaires seront décrites plus en détail dans la première partie de cette thèse, paragraphe I.2.

D'autres tests cellulaires existent, notamment l'étude de la prolifération et de la polarisation des lymphocytes T qui renseigne sur l'allergénicité des protéines dans les hypersensibilités retardées médiées par les lymphocytes T.

II.1.2. Modèles animaux

La pathogenèse de l'allergie alimentaire chez l'homme est complexe et met en jeu des prédispositions génétiques et immunitaires variables, ainsi que des facteurs environnementaux non contrôlables tels que les doses, fréquences et âge d'exposition. Aucun modèle animal ne permettra de prédire la prévalence et la sévérité d'une allergie dans une population exposée à une protéine. Cependant, l'évaluation de l'allergénicité d'une protéine ne nécessite pas forcément le développement d'un modèle « idéal » : une analyse point par point des différentes phases de l'allergie, sur différents modèles comme ceux présentés ci-dessous, pourra permettre de donner des éléments de réponses sur le potentiel allergénique de ces aliments.

Idéalement, les modèles animaux doivent permettre de reproduire les caractéristiques de la réponse IgE (reconnaissance des mêmes protéines au sein d'un aliment et des mêmes épitopes au sein de ces protéines) et des symptômes observés chez le patient allergique. Il existe des modèles animaux de la phase de sensibilisation et de la phase de déclenchement de la réaction allergique. Des modèles animaux permettent également de mettre en évidence un effet adjuvant, c'est-à-dire l'augmentation (ou la diminution) de l'allergénicité d'une autre protéine.

II.1.2.1. Evaluation du pouvoir sensibilisant

Le potentiel sensibilisant de différentes protéines est étudié après administration de la protéine ou de l'aliment seul, c'est-à-dire sans adjuvant, afin que les propriétés sensibilisantes intrinsèques des protéines testées puissent s'exprimer. Dans ce contexte, le cobaye présente l'avantage de pouvoir être sensibilisé à différentes protéines par voie orale, reflétant le processus de sensibilisation chez l'homme [246] et permettant d'évaluer le potentiel de sensibilisation de protéines alimentaires. Cependant, l'utilisation de ce modèle reste limitée du fait des voies de polarisation de la réponse immunitaire qui diffèrent de celles observées chez l'homme, notamment pour l'induction des IgE, et qui sont peu décrites.

D'autres modèles animaux, comme le rat et la souris, présentent l'avantage d'être génétiquement et immunologiquement mieux caractérisés. De plus, les outils et réactifs d'analyse de la réponse immunitaire induite chez ces animaux sont nombreux. A l'inverse, l'administration orale de protéines semble moins appropriée pour ces espèces, chez lesquelles elle induit plutôt un phénomène de tolérance orale [247;248]. Néanmoins, l'administration de blanc d'œuf ou de lait de vache par gavage (i.g.) sur plusieurs semaines chez le rat Brown Norway (BN) conduit à la production d'IgE et d'IgG aux spécificités identiques à celles présentées par les patients allergiques à ces protéines alimentaires [249]. Des protocoles plus courts, utilisant la voie d'administration intra-péritonéale (i.p.) ont par ailleurs été étudiés : des rats BN sensibilisés avec des protéines du lait de vache présentent un répertoire allergénique identique à celui observé avec les IgE de patients allergiques. La spécificité épitopique des IgE était très proche entre les patients allergiques et ce modèle animal [250;251]. Des tests d'administration i.p. de protéines seules ont également été effectués chez la souris BALB/c qui montre une dysrégulation de la production d'IgE liée à un développement biaisé vers le phénotype Th2 [252], mimant ainsi les patients atopiques. Le pouvoir sensibilisant est évalué par la mesure des réponses IgE et IgG spécifiques induites. La capacité des protéines testées à induire une réponse IgE spécifique chez une proportion importante des animaux traités semble refléter leur pouvoir sensibilisant chez l'homme [253]. Des études menées au laboratoire et comparant le potentiel sensibilisant de protéines non connues pour être allergéniques, modérément allergéniques (BLG) ou fortement allergéniques (Ara h 1) semble conforter l'utilisation de ce modèle [254].

Ainsi, malgré une voie de sensibilisation différente de celle observée chez l'homme, la souris BALB/c et le rat BN permettent, par la voie i.p., une étude pertinente du potentiel de sensibilisation des protéines alimentaires.

D'autres modèles font également l'objet de développement chez des animaux plus grands comme le chien après sensibilisation au lait et à la farine [255] ou à l'arachide et à différentes noix [256], ou le porc [257] après sensibilisation à l'arachide. Les réponses observées chez ces animaux sensibilisés miment en partie le spectre de reconnaissance des IgE humaines, et reproduisent une partie des symptômes observés chez l'homme.

II.1.2.2. Evaluation du pouvoir déclenchant

Le déclenchement de la réaction allergique a également été étudié dans des modèles animaux visant à reproduire les symptômes observés chez l'homme. Il s'agit en général

d'animaux qui ont été au préalable sensibilisés expérimentalement à la protéine ou à l'aliment par voie i.g. ou i.p. en présence d'adjuvant, assurant ainsi une production d'IgE optimale sur le plan qualitatif et quantitatif. Ces modèles peuvent alors permettre d'étudier les mécanismes immuno-pathologiques survenant au cours du déclenchement de la réaction allergique. Ainsi, l'analyse des médiateurs et des symptômes induits suite à un test de provocation par l'allergène (ou l'aliment) naturel *versus* modifié sont comparés. Un tel test permet donc d'évaluer les effets des modifications sur le potentiel déclenchant de l'allergène (ou aliment).

Un modèle proposé par Li et coll. consiste à sensibiliser des souris C3H/HeJ par gavage i.g. avec du lait de vache en présence de toxine cholérique (TC). Suite à un test de provocation orale, les souris sensibilisées développent des symptômes systémiques et localisés : choc anaphylactique, augmentation de la perméabilité vasculaire et muqueuse dans l'intestin, inflammation pulmonaire [258]. Les animaux sensibilisés à l'arachide par la même méthode produisent des IgE reconnaissant parfaitement les allergènes majeurs Ara h 1 et Ara h 2. De plus, les régions immunodominantes de Ara h 2 sont reconnues de la même façon par les IgE murines et humaines. Après provocation, les manifestations cliniques sont également celles habituellement observées chez l'homme [259]. Ce modèle de sensibilisation par voie i.g. a été étendu avec succès à la souris BALB/c pour laquelle les allergènes du lait de vache et de l'arachide sont alors les mêmes que ceux identifiés chez l'homme. L'histamine dosée dans les fèces de ces souris après challenge oral par l'aliment sensibilisant met par ailleurs en évidence la survenue d'une réaction allergique locale au niveau intestinal [260].

Des travaux réalisés au laboratoire utilisant une sensibilisation i.p. en présence d'adjuvants tels que l'alum ou l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) ont permis d'établir un modèle d'hyperréactivité bronchique chez la souris BALB/c, en utilisant un allergène du lait de vache, la β LG, comme modèle. Dans un premier temps, la caractérisation fine de la réponse IgE induites chez ces animaux a démontré la production d'IgE spécifiques de la β LG sous sa forme native lorsque l'alum est utilisé comme adjuvant. L'utilisation de l'AIF entraîne la production d'IgE contre la β LG dénaturée (forme réduite et carboxyméthylée, c'est-à-dire dénaturée du fait de la rupture des ponts disulfures de la protéine). Les IgE ainsi produites reconnaissent les même épitopes que ceux caractérisés chez l'homme. Dans un second temps, après sensibilisation par la β LG sous sa forme native, des tests de provocation ont été réalisés par voie intra-trachéale (i.t.) ou intra-nasale (i.n.), permettant respectivement l'analyse des marqueurs précoces (quelques minutes après le test de provocation) et tardifs (24 à 72 h après

le test de provocation) de la réaction allergique. Les tests de provocation ont été réalisés avec la β LG sous conformation native ou sous forme dénaturée. Cette dernière forme ne comporte donc que les épitopes linéaires. Dans les deux cas, une libération d'histamine dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) est observée quelques minutes après la provocation i.t.. Une production de leucotriènes B₄, C₄ et E₄ est également observée, mais exclusivement chez les animaux provoqués par l'allergène natif. A l'inverse, seule la β LG dénaturée induit une forte production de prostaglandine D₂. Une obstruction bronchique est constatée 24 et 72 heures après la provocation i.n., particulièrement lorsque celle-ci est réalisée avec la β LG dénaturée. L'activation des lymphocytes de type Th2 est démontrée par la présence d'IL-4 et/ou d'IL-5 dans les LBA. La présence d'éosinophiles est prépondérante dans les LBA des souris provoquées par la β LG native, mais leur afflux dans le tissu pulmonaire est important dans les deux cas. Ainsi, selon la structure de l'allergène déclenchant, des distorsions de réponses sont constatées, alors même que la séquence d'acides aminés est identique. Ce modèle peut donc permettre de mettre en évidence l'effet inattendu de modifications fines dans la structure de l'allergène [261].

II.1.3. Tests de provocation chez l'homme

Les tests de provocation chez l'homme permettent de confirmer le diagnostic quant à l'implication d'un aliment et/ou plus rarement d'une protéine chez un patient allergique.

II.1.3.1. Tests cutanés

Les tests cutanés d'allergie consistent à mettre en contact les mastocytes dermiques avec les allergènes à tester. Si les mastocytes sont porteurs des IgE spécifiques correspondantes, une dégranulation spécifique est induite provoquant la libération des différents médiateurs chimiques contenus dans les granules. Ce phénomène est responsable de modifications cutanées liées à l'inflammation, notamment l'apparition d'un œdème dont on mesure la papule en millimètres. L'induction de la réaction allergique est locale. Elle écarte tout risque de réactions systémiques sévères, et permet d'envisager le test simultané de différents aliments/protéines, éventuellement avant/après modifications.

Parmi les tests cutanés, les méthodes les plus fréquemment utilisées sont le « skin prick test » (SPT) : un extrait protéique en solution issu de l'aliment suspecté est déposé sur l'avant bras ou sur le dos du patient. Une petite effraction de l'épiderme est réalisée à l'aide

d'une petite pointe cylindrique calibrée d'un millimètre de diamètre, permettant de mettre au contact l'allergène avec les mastocytes cutanés [262]. Des témoins négatif (diluant) et positif (histamine, 1 mg/mL) servent d'éléments de comparaison pour apprécier la significativité et l'amplitude de la réaction allergique. Les résultats finaux sont relevés par rapport à ces témoins au bout de 15 minutes [263]. La réaction est considérée comme positive si le diamètre de l'induration est supérieure d'au moins 3 mm à celle du témoin négatif [263]. Le SPT est sensible, mais s'avère peu spécifique. Jusqu'à 35% des patients dont le SPT est positif n'ont pas d'allergie confirmée par test de provocation oral en double aveugle, et les résultats sont fortement dépendants de l'allergène et de la qualité de l'extrait allergénique utilisé [264-266]. Toutefois, des valeurs prédictives de la taille de la papule au-dessus desquelles les TPO ont 95 % de probabilité d'être positifs ont été déterminées pour l'allergie au lait de vache et à l'œuf. Elles sont de 12,5 et 13 mm respectivement [267]. Cependant, l'intensité des réactions cutanées obtenues n'est pas directement corrélée à la symptomatologie observée lors des TPO [268;269].

Un autre test, le prick-prick test peut également être réalisé. Dans ce test, la pointe calibrée est dans un premier temps introduite dans l'aliment suspecté puis directement dans la peau du patient. La papule est ensuite mesurée comme précédemment.

II.1.3.2. Test de provocation orale

Les tests de provocation orale (TPO) peuvent être réalisés directement (le patient sait qu'il reçoit l'aliment suspecté), ou en simple ou en double aveugle (DBPCFC pour « double-blind, placebo-controlled food challenge » : ni le patient ni le personnel médical ne sait si la substance donnée contient l'allergène suspecté).

Le DBPCFC est la méthode de référence pour diagnostiquer une allergie alimentaire. Il permet d'authentifier l'allergie alimentaire en provoquant les symptômes cliniques et en précisant la dose réactogène. Lors de ce test de provocation, l'aliment est dissimulé dans un aliment non représentatif, dit véhicule. Les doses ingérées sont progressivement croissantes, toutes les 20 à 30 minutes en l'absence de symptôme. Le placebo est donné avec la même progression. Les signes cliniques objectifs concernant les organes suivants sont pris en compte : la peau (érythème, prurit, eczéma, urticaire, œdème), l'appareil bucco-pharyngo-laryngé (rhino-conjonctivite, syndrome oral, prurit oropharyngé, œdème labial, œdème laryngé, dysphagie), les poumons (toux sèche, sifflement, dyspnée, chute du débit expiratoire de pointe ou du volume expiratoire maximum/seconde (VEMS), crise d'asthme), l'appareil

digestif (diarrhée, nausée, vomissement, douleur abdominale), l'appareil cardio-vasculaire (chute de la pression artérielle, augmentation de la fréquence cardiaque) [270]. Compte tenu du risque important, le test est immédiatement interrompu à la moindre manifestation et seules les premières réactions peuvent être observées. Il est de plus nécessaire de réaliser les TPO dans une structure hospitalière, apte à prendre en charge des réactions allergiques graves, géographiquement proche d'une unité de soins intensifs, avec un personnel médical et paramédical spécialisé [271].

Ce test permet de déterminer la quantité d'aliment qui déclenche une réaction (LOAEL pour Lowest Observed Adverse Effect Level) et la plus petite dose qui ne déclenche pas de réactions (NOAEL pour No Observed Adverse Effect Level). Ces doses sont des données très importantes pour évaluer le potentiel allergénique d'un aliment/protéine. Cependant, elles ne semblent pas être corrélées avec la sévérité de la réaction clinique, ni avec la taille du test cutané ou la valeur des IgE spécifiques [143]. Cependant, ce test est contre-indiqué si le patient a une allergie alimentaire sévère, notamment de type anaphylactique. L'étude de l'allergénicité par ce test exclut donc la population d'allergiques ayant des symptômes sévères. De plus, cette méthode, qui nécessite l'hospitalisation de la personne, est lourde, contraignante, et les symptômes engendrés au cours de ce test peuvent être sévères. Pour des raisons éthiques et pratiques, ce test ne peut donc pas être effectué à des fins de recherche : il est effectué pour diagnostiquer une allergie alimentaire et définir les doses réactogènes et symptômes associés qui y sont associés. Peu d'études portant sur l'allergénicité des aliments peuvent donc être confirmées par DBPCFC.

II.2. EFFET DES TRAITEMENTS SUR L'ALLERGENICITE DES ALIMENTS

Il a été suggéré que la résistance d'un allergène alimentaire aux procédés industriels, culinaires puis à la digestion gastro-intestinale est une caractéristique commune des allergènes alimentaires. L'idée sous-jacente est que les allergènes alimentaires doivent atteindre le système immunitaire intacts, ou du moins sous une forme capable d'y induire une réponse immunitaire spécifique [131;272]. Etudier les effets des différents traitements que subissent les aliments sur leur allergénicité permet également de mieux comprendre la relation entre la structure d'une protéine et son allergénicité.

II.2.1. Digestion

La stabilité d'un certain nombre d'allergènes connus du soja, de l'arachide, de la moutarde, de l'œuf et du lait avaient initialement été étudiée en 1996 par Astwood et coll., dans un test *in vitro* simulant la digestion gastrique. Après la digestion, la dégradation/résistance des protéines était suivie par électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) en conditions dénaturantes. Ces premiers travaux démontraient que la plupart des allergènes étudiés étaient caractérisés par une résistance à la dégradation après 60 min de digestion gastrique simulée. A l'inverse, les protéines contrôles non allergéniques se révélaient être très rapidement dégradées. Ces résultats suggéraient donc que la résistance à la digestion gastrique est une caractéristique des allergènes [272]. Cependant, en comparant la résistance à la digestion d'un grand nombre d'allergènes et de protéines non connues pour être allergéniques mais ayant des fonctions biologiques similaires, Fu et coll. ont montré que la majorité des protéines résistantes à la digestion gastroduodénale ne sont pas forcément des allergènes [273].

Bien que des méthodes standardisées de mesure de la résistance à l'action de la pepsine aient été proposées pour permettre une évaluation de l'allergénicité des « Nouveaux Aliments » [274], de nombreux modèles de digestibilité *in vitro* ont maintenant été développés. Ils utilisent la pepsine (digestion gastrique) et la trypsine/chymotrypsine (digestion duodénale) dans des conditions plus physiologiques. Les valeurs réelles du pH et de son évolution, du ratio enzyme:protéine sont prises en compte, ainsi que la présence d'agents surfactants pouvant conduire à des modifications de structure des protéines alimentaires, les protégeant éventuellement des attaques enzymatiques [275]. Les profils électrophorétiques en SDS-PAGE réalisés avant et après digestion permettent d'observer la disparition ou non de la protéine intacte au profit de l'apparition de peptides de plus faible masse moléculaire. Les analyses en électrophorèse en conditions dénaturantes, peu sensibles, ne permettent pas d'évaluer l'immunoréactivité résiduelles des fragments générés lors de la digestion, ni les (ré)associations éventuelles de ces fragments peptidiques en entités immunoréactives. A titre d'exemple, même si les fragments protéiques générés au cours de la digestion du kiwi ne sont pas visibles par SDS-PAGE, ils peuvent être détectés par immunoempreinte [276]. De plus, ce n'est pas parce qu'un allergène est dégradé que les produits de dégradation ne sont plus immunoréactifs. Ainsi des analyses permettant d'observer et d'évaluer l'immunoréactivité et les structures des digestats sont nécessaires. Ces

analyses reposent sur des techniques électrophorétiques en conditions non dénaturantes et des immunoempreintes avec des IgE de patients allergiques, des études de capacité de liaison aux IgE par tests enzymo-immunologiques directs ou en inhibition, des études du potentiel de dégranulation dans des tests cellulaires ou *in vivo* par SPT.

Ainsi, même si la comparaison des différentes études réalisées jusqu'à maintenant n'est pas aisée du fait de méthodologies variées, elles mettent en évidence une différence de résistance à la digestion entre les allergènes alimentaires vrais et incomplets. Il a, par exemple, été rapporté que les patients allergiques au kiwi ayant des symptômes oraux (réaction secondaire croisée avec l'allergène du bouleau Bet v 1) sont sensibilisés à des allergènes qui sont rapidement dégradés par la digestion gastrique et/ou duodénale, alors que les patients ayant des réactions systémiques sont sensibilisés à des allergènes résistants à la digestion [276]. Nous allons donc voir plus en détail l'effet de la digestion sur les allergènes alimentaires vrais, capables de sensibiliser et de déclencher la réaction allergique au niveau du tractus gastro-intestinal, et sur les allergènes alimentaires incomplets, incapables de sensibiliser un individu *de novo* mais pouvant induire des réactions allergiques chez des individus déjà sensibilisés à des allergènes homologues.

II.2.1.1. Effet de la digestion sur l'allergénicité des allergènes vrais

Beaucoup d'allergènes alimentaires d'origine végétale appartiennent à la superfamille des prolamines, qui comprend les protéines de transfert de lipides non-spécifique (nsLTP) (Pru p 3 de la pêche, Pru av 3 de la cerise, Cor a 8 de la noisette, Vit v 1 du raisin, ...), les albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6 de l'arachide, Ber e 1 de la noix du Brésil, Ses i 1 du sésame, ...), les inhibiteurs d' α -amylase et de protéase ainsi que les prolamines de céréales [277]. Ces protéines ont une structure très compacte due à la présence de nombreux ponts disulfures, masquant les sites de clivage enzymatique et leur conférant ainsi une forte résistance à la digestion par la pepsine. Ainsi, l'allergène de la cerise Pru av 3 n'est pas dégradé après 2 h de digestion gastrique et est toujours immunologiquement actif [278]. Les albumines 2S de l'arachide sont également fortement résistantes à la dégradation enzymatique et malgré une dégradation partielle, leur immunoréactivité est conservée [185]. Pour certains allergènes de la superfamille des prolamines, la résistance à la digestion gastroduodénale peut également n'être que partielle mais elle conduit à la génération de fragments protéiques conservant une immunogénicité et une réactivité suffisante pour induire la sensibilisation et le déclenchement de la réaction allergique au niveau gastro-intestinal. C'est le cas pour la nsLTP

du raisin (Vit v 1) qui est partiellement dégradée par digestion gastroduodénale et qui conduit à la génération d'un fragment peptidique d'environ 6000 Da présentant la même capacité de liaison aux IgE et le même pouvoir de dégranulation des basophiles que l'allergène natif [279]. Suite à la digestion gastroduodénale de l'albumine 2S de la noix du Brésil (Ber e 1), très peu de protéines demeurent intactes et des petits fragments sont générés. Ces fragments s'assemblent via des ponts disulfures en une entité d'une masse d'environ 5000 Da qui contient les épitopes T et B identifiés sur cet allergène [280].

D'autres allergènes alimentaires d'origine végétale appartiennent à la superfamille des cupines qui comprend les vicilines et les légumineuses. Ces protéines ont en commun une structure en tonneaux β qui semble être stable à la protéolyse [277;281]. Dans le cas de la globuline 7S de l'arachide (Ara h 1), de nombreux épitopes de cet allergène sont préservés malgré une hydrolyse par la pepsine [282]. D'autres études plus récentes ont montré que la digestion *in vitro* de Ara h 1 conduit à une dégradation très rapide de la protéine. Toutefois, les produits issus de cette dégradation s'organisent en agrégats qui seraient responsables de la forte allergénicité de Ara h 1 après digestion [118;186].

Certaines familles de protéines impliquées dans la défense des végétaux contre le stress ou les infections sont également responsables de réactions allergiques. Une étude récente a précisé les changements de structures qui ont lieu durant la digestion gastroduodénale de deux des allergènes du kiwi, l'actinidine Act d 1 et la protéine homologue de la thaumatococcus, Act d 2. Pendant la digestion gastrique à pH 2, Act d 1 précipite et la digestion de la protéine agrégée est lente. Le précipité résiduel se redissout ensuite complètement dans le fluide de digestion duodénale à pH 6,5 et est partiellement dégradé. Tandis que 40% de Act d 2 restent intacts après digestion gastrique, les protéases duodénales clivent les protéines résiduelles en de grands fragments qui se réassocient de façon covalente par des ponts disulfures. Après digestion gastroduodénale, malgré ces importants changements de structure, ces deux protéines montrent des capacités de liaison aux IgE pratiquement équivalentes à celles des protéines non digérées [283].

Pour ce qui est des allergènes alimentaires d'origine animale, il semble qu'il n'y ait pas de règle quant à leur sensibilité à la digestion. Certains apparaissent sensibles à la digestion, comme par exemple les allergènes du poisson [284], du buccin [285] ou des viandes de bœuf et de mouton [286] pour lesquels la digestion entraîne non seulement une destruction, mais également une perte de leur immunoréactivité vis-à-vis des IgE de patients allergiques. A l'inverse, d'autres allergènes animaux tels que la β LG du lait de vache sont

caractérisés par une certaine résistance à la dégradation par la pepsine [275;287]. Différentes cinétiques de digestion duodénale sont en effet observées pour les protéines du lait de vache. L' α -lac et la β LG sont hydrolysées beaucoup plus lentement que les caséines [288]. Cependant, les travaux déjà anciens de Haddad [289] confirmés par Selo et coll. [290] ont montré que l'allergénicité de la β LG n'était pas directement liée à sa résistance à la digestion ni associée à l'intégrité de la molécule. Au contraire, la protéolyse de la β LG peut augmenter sa capacité de liaison aux IgE de certains patients allergiques en révélant des épitopes enfouis au sein de la structure tertiaire de la protéine.

D'autres allergènes animaux sont caractérisés par une certaine résistance à la digestion comme l'ovomucoïde de l'œuf ou la tropomyosine de la crevette [291]. Urisu et coll. [292] et Yamada et coll. [293] ont démontré que la digestion gastroduodénale de l'ovomucoïde de l'œuf génère des fragments résistants conservant une capacité de liaison aux IgE. Les auteurs ont également remarqué que les IgE de patients sensibilisés à l'œuf (présence d'IgE spécifiques et SPT positifs) mais n'ayant pas d'allergie clinique à l'œuf (TPO négatif) ont une plus faible immunoréactivité vis-à-vis des digestats trypsiques et chymotrypsiques que les IgE des patients ayant une allergie à l'œuf prouvée par TPO positif.

II.2.1.2. Effet de la digestion sur l'allergénicité des allergènes incomplets

Parmi les allergènes incomplets, on retrouve les allergènes homologues de l'allergène du pollen de bouleau Bet v 1 qui induisent des réactions allergiques localisées dans la cavité buccale chez des sujets ayant une pollinose au bouleau. Ils sont notamment présents dans la pomme (Mal d 1), la noisette (Cor a 1.04), le céleri (Api g 1) ou la cerise (Pru av 1). Les allergènes homologues de Bet v 1 sont rapidement dégradés lors de la digestion gastrique. Les produits de la digestion perdent rapidement leur capacité de se lier aux IgE et donc de provoquer une libération d'histamine au niveau intestinal. Cependant, certains de ces allergènes restent capables d'induire la prolifération des cellules T après digestion, pouvant expliquer l'apparition de symptômes cutanés T-dépendants [278;294]. Une autre famille de protéines, connue pour avoir des réactions croisées avec Bet v 2 du pollen de bouleau, est la famille des profilines, incluant Pru av 4 de la cerise, Pyr c 4 de la poire et Api g 4 du céleri [295]. Ces allergènes sont également rapidement dégradés par digestion gastroduodénale, dégradation s'accompagnant d'une perte de leur immunoréactivité [278;296].

Une autre catégorie d'allergènes incomplets appartient à la famille des chitinases de classe I et est impliquée dans des réactions croisées avec l'hévéine (Hev b 6.02) et/ou la

profiline (Hev b 8) du latex. Parmi ces allergènes, on retrouve Prs a 1 de l'avocat ou Mus xp 1 de la banane [297-299]. Yamagi et coll. ont montré que la plupart de ces protéines purifiées du latex, de la pomme-de-terre, ou de différents fruits (avocat, kiwi, banane, melon et pêche) sont dégradées après 8 min de digestion gastrique et ne montrent plus d'immunoréactivité avec les IgE de patients allergiques au latex [300]. Ces résultats ont été confirmés par Lucas et coll. chez des patients allergiques au kiwi qui ont des symptômes oraux (allergie secondaire avec le latex). Ces patients sont sensibilisés à des allergènes qui se dégradent rapidement au cours de la digestion [276]. Cependant, bien que le digestat de Prs a 1 de l'avocat, ne montre plus de fragments détectables par SDS-PAGE, ni par immunoempreinte avec des IgE de patients allergiques, des tests d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques ont montré que certains peptides issus de la digestion ont conservé une forte capacité de liaison aux IgE. De plus, les digestats de Prs a 1 provoquent des SPT positifs chez certains patients [301].

Ces études de résistance à la protéolyse permettent en partie d'expliquer pourquoi les allergènes alimentaires incomplets sont incapables de sensibiliser l'organisme *de novo*. Ils sont cependant capables de déclencher chez des sujets déjà sensibilisés une réaction allergique, qui conduit généralement à un syndrome oral résultant d'une allergie croisée avec des allergènes du pollen de bouleau ou du latex. Ainsi, même si ces allergènes sont rapidement dégradés au cours de la digestion, des réactions allergiques localisées dans la cavité orale ont lieu avant la digestion de l'allergène par l'individu. Certains de ces allergènes incomplets peuvent néanmoins conserver une faible immunoréactivité après digestion, tel que Prs a 1 par exemple.

Des facteurs autres que la simple résistance à la digestion, rentrent en jeu pour expliquer l'allergénicité d'une protéine. Il est à noter par exemple que l'abondance relative d'un allergène influence la dose d'allergène qui survit à la digestion gastroduodénale [302]. Ainsi certaines protéines allergéniques, fortement présentes dans certains aliments, représentent une part importante de l'apport protéique de l'alimentation. La forte quantité ingérée limiterait leur dégradation par la digestion gastroduodénale. Cela pourrait être la raison de leur fort potentiel de sensibilisation et de déclenchement de la réaction allergique au niveau gastro-intestinal. De plus, il a été montré qu'une augmentation du pH de 1,5 à 2,5 réduit significativement la dégradation des allergènes du kiwi [276]. Il est donc important de bien contrôler les différents paramètres dans ces modèles de digestion *in vitro*. Le pH et le

ratio de protéases par rapport à la quantité de protéines ne sont en effet pas toujours équivalents d'une étude à l'autre.

Il est également important de prendre en compte la susceptibilité individuelle *in vivo*. Des études de digestibilité *in vivo* du lait de vache et de l'arachide ont en effet été menées chez des sujets non allergiques lors du programme européen Allergest [303]. L'analyse des prélèvements gastriques a montré que les profils de digestion sont très variables d'un sujet à l'autre, confirmant l'existence de « digesteurs lents » et de « digesteurs rapides ». La digestion gastrique *in vivo* de l'arachide conduit néanmoins à des résultats comparables à ceux obtenus *in vitro* : dégradation rapide de Ara h 1 et plus lente de Ara h 2 et Ara h 6, génération de fragments peptidiques, et conservation de l'immunoréactivité de l'arachide. A l'inverse, dans le cas du lait de vache, la digestion conduit à une perte de l'immunoréactivité de la β LG et des caséines [161;303]. Ces études de digestion *in vivo* ont cependant été réalisées chez l'adulte, pour lequel les conditions de digestion ne sont pas les mêmes que chez l'enfant de moins de 3 ans, majoritairement concerné par l'allergie au lait de vache.

II.2.2. Traitements thermiques

Le chauffage peut également altérer la structure des protéines, ce qui peut entraîner une modification de leur allergénicité et/ou de leur susceptibilité à la digestion. La nature et l'importance des changements qui se produisent dépendent de la température et de la durée de chauffage, ainsi que des caractéristiques intrinsèques de la protéine et des conditions physico-chimiques de l'environnement dans lesquelles le traitement s'effectue. Les traitements thermiques entraînent typiquement la perte de la structure tertiaire (réversible), la perte de la structure secondaire (55-70°C), le clivage des ponts disulfures (70-80°C), la formation de nouvelles interactions intra-/intermoléculaires, un réarrangement des ponts disulfures (80-90°C) et la formation d'agréats (90-100°C) [304]. Des modifications chimiques des protéines peuvent également se produire à plus hautes températures (100-125°C et plus).

Au cours des traitements thermiques, différentes réactions peuvent se produire. Les réactions de Maillard, ou brunissements non-enzymatiques, sont l'ensemble des interactions résultant de la réaction entre un sucre réducteur et un groupement aminé. Ces réactions peuvent se produire lors du chauffage des aliments, entre les résidus lysine d'une protéine et les sucres de la matrice alimentaire. D'autres types de modifications peuvent impliquer la

liaison de lipides oxydés avec les protéines et ainsi contribuer à la formation d'une nouvelle structure immunologiquement réactive.

Il semble qu'il n'y ait pas de règles générales en ce qui concerne les conséquences d'un traitement thermique sur l'allergénicité. Certains allergènes, ou mieux certains aliments allergéniques, sont décrits comme étant résistants à la chaleur (comme le lait, l'œuf, le poisson, l'arachide), alors que d'autres sont considérés comme étant partiellement stables (soja, céréales, céleri, noix) ou labiles (fruits de la famille des Rosacées et les carottes) [305]. Dans la littérature, il y a de grandes différences dans les protocoles de chauffage utilisés tant au niveau du matériel utilisé (allergène purifié *versus* aliment entier), de la température, de la durée, que des conditions dans lesquelles sont réalisées ce chauffage (à sec, en solution aqueuse, dans une solution contenant des sucres, des lipides, ...). Il y a également une grande diversité des méthodes employées pour évaluer l'allergénicité de ces protéines modifiées. Il est donc difficile de comparer les résultats de ces expériences.

II.2.2.1. Effet du chauffage sur les allergènes purifiés

Nous allons tout d'abord nous attacher à étudier les résultats obtenus pour des allergènes purifiés, dans des protocoles n'induisant pas de produits de la réaction de Maillard, c'est-à-dire l'effet du chauffage seul.

Dans ces protocoles, il semblerait que, comme pour la résistance à la digestion, les allergènes incomplets soient moins résistants aux procédés thermiques que les allergènes alimentaires vrais. Ainsi, les prolamines sont assez résistantes aux traitements thermiques. A titre d'exemple, les nsLTP de la cerise (Pru av 3) et de la pomme (Mal d 3) conservent leur allergénicité après traitement thermique modéré [278;306] même s'il a été montré que des traitements thermiques plus sévères peuvent induire une diminution significative de l'immunoréactivité de Mal d 3 [306]. Quant au chauffage des allergènes incomplets, il entraîne généralement la perte de leur allergénicité. Bohle et coll. ont montré que la capacité des allergènes recombinants Bet v 1 (pollen de bouleau), Mal d 1 (pomme), Api g 1 (céleri) et Dau c 1 (carotte) à induire la dégranulation de cellules effectrices n'est pas modifiée par le chauffage 30 min à 40°C des protéines. A 60°C, une perte totale de la capacité de dégranulation est constatée pour Api g 1. Pour les autres protéines, cette perte complète a lieu après chauffage à 80 ou 100°C [307]. La perte de l'immunoréactivité des IgE des protéines homologues à Bet v 1 est également confirmée au travers d'autres études pour Pru av 1 de la cerise [278] et de Prs a 1 de l'avocat [308].

II.2.2.2. Effet de la génération de produits de la réaction de Maillard au cours du chauffage

De nombreuses études tentent de reproduire des interactions qui peuvent avoir lieu dans l'aliment. Ainsi, en chauffant l'allergène purifié en présence de différents sucres, des produits de la réaction de Maillard sont formés.

La formation de produits de Maillard au cours du chauffage de protéines peut avoir un effet protecteur. C'est en effet le cas pour Mal d 3 (nsLTP de la pomme) pour qui un chauffage drastique à 100°C pendant 2 h sans glucose entraîne la diminution d'un facteur 30 de sa capacité de liaison aux IgE et d'un facteur 100 à 1000 de sa capacité à induire la dégranulation des cellules effectrices. La capacité de liaison aux IgE n'est réduite que d'un facteur 2 et la capacité à induire la dégranulation d'un facteur 10 par ajout de glucose pendant le chauffage [306].

Ces produits de la réaction de Maillard générés pendant le chauffage peuvent même être à l'origine d'une allergénicité accrue de la protéine. Gruber et coll. ont en effet montré que le traitement thermique de Ara h 2 recombinant en présence de sucres induit une augmentation significative de sa capacité de liaison aux IgE. Curieusement, ni les 2 résidus lysine de Ara h 2 ni sa partie N-terminale ne sont impliqués dans la formation par la réaction de Maillard de ces structures fortement affines, mais il semblerait que ce soient des acides aminés non basiques qui aient pu lier les sucres [309]. De la même façon, Maleki et coll., ont montré que Ara h 1 et Ara h 2, après réaction de Maillard (incubation à 55°C pendant 10 jours avec 200 mM de différents sucres) présentent des réactivités différentes : elles sont plus immunoréactives, plus stables aux traitements thermiques et à la digestion gastroduodénale [310].

II.2.2.3. Effet du chauffage sur l'aliment entier

Les traitements thermiques réalisés sur des aliments entiers permettent de prendre en compte les interactions éventuelles avec d'autres composants de l'aliment, réactions de Maillard mais également interactions avec des lipides et/ou d'autres protéines.

La résistance aux traitements thermiques varie pour les différentes protéines d'un même aliment. Une extraction de maïs, réalisée avant et après un traitement thermique de 160 minutes à 100°C, montre que l'immunoréactivité des bandes de haut poids moléculaire est pratiquement éliminée mais que le traitement thermique n'affecte pas l'immunoréactivité des

nsLTP [311]. Une autre étude révèle la présence d'une protéine résistante de 50 kDa dans une préparation de polenta cuite pendant 30 min [312].

La prévalence de l'allergie à l'arachide dépend des habitudes alimentaires et du type de cuisson traditionnellement utilisé dans les populations de différents pays [313]. En effet, le traitement thermique des arachides à des températures assez faibles tels que les faire bouillir (100°C) ou frire (120°C), entraîne des changements de conformation mais ne génère pas de produits de la réaction de Maillard, et les propriétés allergéniques de l'arachide ainsi chauffée sont inchangées. A l'inverse, lorsque des produits de la réaction de Maillard sont générés, l'allergénicité de l'arachide est augmentée. Maleki et coll. ont étudié l'allergénicité d'extraits protéiques d'arachides crues ou grillées (généralement à 140°C pendant 40 min). L'affinité apparente des IgE spécifiques est augmentée environ d'un facteur 90 pour les arachides grillées vs crues [310]. Cette augmentation de l'allergénicité est due à la formation de produits de la réaction de Maillard, ainsi qu'au démasquage d'épitopes lors du grillage de l'arachide [282;314]. Mondoulet et coll. ont plus récemment comparé l'allergénicité des protéines d'arachide extraites d'arachide crue, bouillie ou grillée. Ils n'a pas été observé de différence d'immunoréactivité entre l'extrait protéique issu d'arachide grillée vs crue. Par contre, l'immunoréactivité IgE des allergènes purifiés Ara h 1 et Ara h 2 issus de l'arachide grillée est plus élevée que celle des mêmes allergènes extraits de l'arachide bouillie ou crue. Par ailleurs, la capacité de liaison aux IgE de l'extrait protéique issu d'arachide bouillie s'est révélée être 2 fois plus faible que pour les extraits protéiques d'arachide crue ou grillée. Cette diminution d'allergénicité pourrait s'expliquer par le transfert dans l'eau de cuisson de protéines de faible poids moléculaire liant les IgE [315].

A l'inverse de l'arachide, le grillage de la noisette réduit significativement son allergénicité. Hansen et coll. ont ainsi montré que dans une population de patients allergiques au pollen de bouleau et à la noisette crue (impliquant donc les homologues de Bet v 1), le grillage réduit significativement l'allergénicité des noisettes. Il apparaît que l'affinité apparente des IgE spécifiques est diminuée d'un facteur 100 environ après grillage de la noisette [225].

En ce qui concerne les allergènes d'origine animale, il semble que la cuisson dénature un certain nombre de protéines, certaines demeurant tout de même résistantes et conservant un potentiel allergique comme la crevette [316]. La cuisson de la viande et du poisson génère la formation de congglomérats qui ont une réactivité vis-à-vis des IgE de patients allergiques [317;318]. D'autre part, faire bouillir du lait permettrait de diminuer son allergénicité par

dénaturation d'allergènes majeurs tels que la β LG [200;319]. A l'inverse, la pasteurisation du lait (chauffage à 75°C) semble en augmenter légèrement l'allergénicité [320].

II.2.2.4. Impact sur la digestibilité

La cuisson peut également avoir un impact sur la digestibilité des allergènes par la suite. A titre d'exemple, Simonato et coll. ont montré que pendant la digestion *in vitro* de pâte à pain non cuite, les protéines liant les IgE de patients allergiques ont tendance à disparaître tandis que la reconnaissance par les IgE de protéines allergènes est conservée au cours de la digestion de la mie et de la croute du pain cuit [321].

II.2.3. Autres procédés industriels

Au cours de la préparation des aliments dans l'industrie, de nombreux procédés sont utilisés et peuvent avoir un effet sur l'allergénicité des aliments. Les préparations industrielles sont souvent le résultat d'un enchaînement de procédés technologiques multiples et variés. Ces traitements industriels (cuisson, hydrolyse, désamidation, protéolyse, modification du pH, raffinage, etc.) ont en général pour but la stabilisation, la conservation et l'homogénéisation des produits, et non pas une diminution de l'allergénicité des aliments, excepté pour les laits et aliments infantiles hypoallergéniques. Outre l'effet du chauffage que nous avons déjà abordé, ces procédés auront des effets variables sur l'allergénicité selon l'aliment et le traitement considérés.

II.2.3.1. Diminution du potentiel allergénique

Une préparation industrielle à base de kiwi incluant, entre autres procédés mécaniques, 4 étapes de traitements thermiques dans différentes conditions (90°C pendant 5 min, 115°C pendant 15s, 110°C pendant 15s et finalement 21min à 65°C) entraîne une perte totale de l'allergénicité des protéines de kiwi, les SPT et les DBPCFC étant négatifs chez tous les patients allergiques au kiwi testés [322]. L'étude de Scheurer et coll. a comparé la réactivité de l'allergène de cerise Pru av 1 extrait d'un jus de fruits, de cerises confites ou de confiture. L'immunoréactivité de Pru av 1 est totalement perdue dans le jus de fruits, et légèrement conservée dans les confitures et les fruits confits [278].

Concernant les produits animaux, la fermentation entraîne une légère diminution de l'allergénicité du lait de vache [323;324]. Les procédés industriels de chauffage, les homogénats de bœuf ou la lyophilisation du bœuf abolit complètement l'allergénicité de la viande de bœuf [325].

II.2.3.2. Conservation/protection du potentiel allergénique

Des préparations industrielles à base de mangue, une purée et un nectar, qui subissent de nombreux procédés, dont des procédés thermiques et mécaniques, ne montrent pas de modification de l'allergénicité de la mangue [326]. De même, l'allergénicité des protéines d'amande est inchangée après des traitements comme le grillage à sec, le chauffage sous haute pression, le blanchiment ou le chauffage au micro-onde [327]. L'ébullition, le chauffage sous haute pression, le chauffage au micro-onde ou l'extrusion induisent peu de changement dans le profil protéique en SDS-PAGE et dans la reconnaissance par immunoempreinte des allergènes du lupin. Seul un chauffage sous haute pression pendant 30 min à 138°C a des effets importants sur l'intégrité de la structure protéique et anéantit l'allergénicité des protéines de lupin. Toutefois, ce traitement génère un nouveau fragment protéique immunoréactif [328].

II.2.3.3. Augmentation du potentiel allergénique et/ou formation de néoallergènes

Un traitement à l'éthylène, procédé accélérant le mûrissement de certains fruits et légumes, peut conduire à la génération de nouvelles entités immunoréactives. Le petit pois contient une protéine chitinase de classe I mais ne fait pas partie des aliments qui causent le syndrome latex-fruit. Suite au traitement à l'éthylène, une chitinase de classe I immunoréactive est générée, croisant avec l'allergène de l'avocat Prs a 1 [308].

Les isolats et/ou hydrolysats de blé sont des préparations industrielles à base de gluten. Ils sont rendus solubles par désamidation du gluten et sont utilisés dans l'industrie comme liant des charcuteries, dans la chapelure, les pâtes alimentaires, également comme clarifiants de certains vins rouges et en cosmétologie. Des réactions anaphylactiques suite à l'ingestion d'isolats de blé ont été observées, non seulement chez des patients allergiques au blé mais aussi chez des individus consommant régulièrement des céréales sans problème. Il y aurait production de néoallergènes lors du traitement industriel et augmentation de l'allergénicité des protéines du blé natif [329].

Les lécithines sont obtenues à partir des fractions lipidiques de certains aliments et peuvent contenir des traces de protéines résiduelles de l'aliment natif. Les lécithines de soja et d'œuf (E322) sont largement utilisées comme émulsifiants. Les réactions allergiques liées à leur consommation sont rares. Toutefois, chez des patients très fortement allergiques au soja et à l'œuf, la proportion de protéines résiduelles de soja (qui varie de 100 à 1400 ppm) ou d'œuf peut être suffisante pour induire des symptômes [330].

II.2.4. Matrice alimentaire

Un aliment n'est pas ingéré seul, mais est intégré dans une préparation alimentaire complexe. C'est cet ensemble qui subit les divers procédés technologiques industriels et les différents traitements thermiques au cours de la préparation en industrie et au domicile avant d'être ingéré par l'individu. Cette matrice alimentaire aura un effet significatif sur l'allergénicité d'une/des protéines présentes dans l'aliment complexe. Grimshaw et coll. ont montré que des patients allergiques à l'arachide soumis à un DBPCFC réagissent à des doses-seuils d'arachide plus élevées si le taux en lipide du véhicule est augmenté. Les épitopes des allergènes d'arachide seraient inaccessibles du fait de la présence de cette matrice lipidique, et/ou la libération des allergènes serait plus lente et progressive. Les auteurs ont également constaté que la présence de la matrice lipidique inhibe la détection *in vitro* des allergènes [331]. Dans ce sens, van Wijk et coll. ont observé que les allergènes purifiés de l'arachide possèdent un pouvoir de stimulation du système immunitaire moindre qu'un extrait allergénique total chez les souris, suggérant un effet adjuvant de la matrice alimentaire [165].

La matrice alimentaire peut également avoir une influence sur la susceptibilité des protéines à la digestion et sur l'absorption de celles-ci au niveau du tractus gastrointestinal. Un allergène devant en théorie atteindre le système immunitaire sous une forme immunologiquement active, ces facteurs sont importants pour déterminer le potentiel allergénique d'une protéine dans un aliment. Une matrice lipidique et/ou une émulsion augmentent l'absorption gastrointestinale de l'allergène de soja Gly m Bd 30k chez des souris [332]. En présence de polysaccharides, comme la gomme arabique ou le xylane, la digestion gastroduodénale *in vitro* de protéines d'arachide est ralentie [333]. De la même façon, la présence de pectine protège la β LG [334] ou les protéines de kiwi [335] de la digestion gastrique. Il a également été remarqué que la cinétique d'hydrolyse d'une protéine purifiée est différente de celle d'une protéine dans un aliment entier. Ainsi, les protéines du lait de vache

sont digérées plus lentement quand elles sont dans du lait cru que quand elles sont sous forme de protéines purifiées [288].

Même si l'allergénicité d'une protéine résulte en partie de propriétés intrinsèques, il n'y a pas de relation clairement établie entre la structure d'une protéine et son allergénicité. En plus des traitements technologiques et du rôle de la matrice alimentaire dans l'allergénicité d'une protéine, c'est l'interaction complexe de tous ces facteurs avec l'environnement et le système immunitaire de l'hôte qui résultera finalement en l'induction ou non d'une sensibilisation allergique.

III. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE

Les allergies alimentaires posent un véritable problème de santé publique du fait de l'augmentation de leur prévalence, de symptômes cliniques associés de plus en plus graves, et de l'émergence de nouveaux aliments allergéniques. De part l'analyse du mécanisme de la réaction allergique, nous avons mis en évidence le rôle central des IgE dans les deux phases de la réaction allergique. L'étude de la sensibilisation à un allergène permet de révéler la présence d'IgE spécifiques dans les sérums des patients. Les tests réalisés ne démontrent cependant que la présence d'une liaison simple IgE-allergène. Dans la phase de déclenchement de la réaction allergique, le pontage par l'allergène des IgE spécifiques fixées sur les FcεRI exprimés par les cellules effectrices nécessite en théorie la liaison de l'allergène par au moins 2 molécules d'IgE distinctes, il implique donc plusieurs épitopes sur un même allergène. Les tests d'activation ou de dégranulation de cellules effectrices permettent donc d'évaluer la capacité d'un allergène à déclencher la réaction allergique.

Le laboratoire disposait de nombreux outils permettant d'analyser la réponse IgE de patients allergiques envers un aliment/protéine allergénique mais il ne disposait pas d'un modèle cellulaire pour caractériser la fonctionnalité de la liaison IgE-allergène. Un premier objectif de ma thèse a donc été de développer un test cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Le choix de la lignée cellulaire et l'optimisation du modèle cellulaire seront présentés dans la première moitié du premier chapitre. Dans cette introduction, nous avons également souligné l'importance des allergies au lait et à l'arachide et la complexité de ces allergies, due notamment à la présence de nombreuses protéines allergéniques dans ces aliments. Le modèle cellulaire optimisé a donc été appliqué à l'étude des allergènes purifiés du lait et de l'arachide afin de déterminer et de comparer leur potentiel de dégranulation, c'est-à-dire leur capacité à induire la dégranulation de ces cellules. Ces résultats sont présentés dans la deuxième moitié du premier chapitre.

Finalement, nous avons souligné dans cette introduction l'effet que pouvaient avoir différents traitements (digestion, chauffage, procédés industriels, inclusion dans une matrice alimentaire) sur l'allergénicité des protéines/aliments allergéniques. Dans le second chapitre de cette thèse, nous présenterons des travaux réalisés afin d'étudier l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité d'une protéine de l'arachide, Ara h 1. Pour cette étude, le modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique a été utilisé. Du fait de l'importance de l'utilisation de plusieurs modèles pour l'évaluation de l'allergénicité d'une

protéine, nous avons également étudié l'effet de ces traitements sur la capacité de liaison de Ara h 1 aux IgE de patients allergiques, et sur son potentiel de déclenchement de la réaction allergique *in vivo*, dans un modèle animal.

Au travers de cette partie introductive, nous avons pu voir l'importance, dans la réaction allergique, de la rencontre entre un allergène et les IgE du patient allergique. L'étude d'une telle relation peut faire appel à une multitude de tests *in vivo* ou *in vitro*. Les tests *in vivo* tels que les tests cutanés permettent d'identifier la source allergénique et certains de ses composés allergéniques, et sont donc un outil diagnostique indispensable aux cliniciens et aux patients. Cependant, pour des raisons éthiques, les tests *in vivo* ne sont pas réalisables à des fins de recherche, encore moins avec des matériels dont la qualité sanitaire n'est pas toujours bien contrôlée. De plus, ils ne rendent pas compte précisément et uniquement des interactions entre IgE et allergènes. Les tests *in vitro* d'étude de la liaison des IgE aux allergènes peuvent permettre d'échapper à ces contraintes. Cependant, basés sur des techniques d'immunoempreinte ou sur des dosages immuno-analytiques, ces tests mettent en jeu des liaisons monovalentes IgE-allergènes, et ne reflètent donc pas l'activité biologique de cette liaison. A l'inverse, les tests *in vitro* utilisant des cellules effectrices de l'allergie permettent d'observer les conséquences de la reconnaissance entre les allergènes et les IgE de patients allergiques, et ainsi d'estimer le potentiel allergénique de ces protéines. La relation entre les IgE et les allergènes est alors analysée dans un contexte cellulaire au cœur du processus inflammatoire de la réaction allergique. Ces tests cellulaires reposent idéalement sur l'utilisation de basophiles humains issus de patients allergiques, c'est-à-dire de basophiles déjà sensibilisés par les IgE du patient. Ils peuvent également être isolés de patients non allergiques, une sensibilisation *in vitro* des basophiles étant alors réalisée à l'aide de sérums de patients allergiques. Un tel test nécessite toutefois l'obtention de prélèvements sanguins humains importants pour en isoler les basophiles en quantité suffisante. D'autre part, les échantillons sanguins doivent être traités rapidement après prélèvement. L'ensemble de ces contraintes rend difficile l'utilisation de tels prélèvements sanguins humains à des fins de recherche et non de diagnostic. Par contre, l'utilisation de lignées cellulaires stables (pouvant être mises en culture) faciliterait la conduite de projets de recherche sur l'étude du potentiel de déclenchement des allergènes. Des lignées cellulaires humaines de basophiles (HMC-1 [336]) ou de mastocytes (KU812 [337] et LAD-1 et LAD-2 [338]) ont été caractérisées. Cependant, ces lignées cellulaires ne sont pas adaptées pour étudier la dégranulation *via* le pontage des IgE : les basophiles de la lignée HMC-1 n'expriment pas le FcεRI humain [339] et les mastocytes de la lignée KU812 n'induisent pas de dégranulation par pontage des IgE [340].

Enfin, les mastocytes LAD-1 et LAD-2 ont un temps de doublement en culture très long (2 à 3 semaines) [338]. Pour ces raisons, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'une lignée cellulaire de rat immortalisée et humanisée, la lignée RBL SX-38 dérivée de la lignée RBL 2H3. Nous allons donc décrire ces lignées cellulaires en introduction.

I. INTRODUCTION

I.1. LA LIGNEE CELLULAIRE D'ORIGINE : RBL 2H3

Les cellules RBL (ou Rat Basophilic Leukaemia) ont été initialement décrites comme étant des basophiles de rat [341]. Par la suite, il a été démontré que ces cellules s'apparentaient en fait à des mastocytes de type muqueux [342]. Après immortalisation cellulaire, une lignée cellulaire RBL 2H3 a été isolée et sélectionnée pour sa capacité à sécréter des quantités importantes d'histamine à la suite d'une activation médiée par les IgE [343]. Ces cellules restent amplement utilisées pour des tests de dégranulation avec des sérums d'origine murine (rat, souris).

I.2. HUMANISATION DES CELLULES RBL 2H3

Cependant, les IgE humaines provenant de sérums de patients allergiques ne peuvent pas se lier naturellement aux récepteurs des cellules d'autres espèces. A partir de la lignée RBL 2H3, des lignées transfectées par tout ou partie du récepteur de haute affinité aux IgE (FcεRI) humaines ont été développées. De nombreuses équipes ont dans un premier temps développé des lignées exprimant seulement la chaîne α du récepteur aux IgE humaines [344-348]. Des transfections dans des cellules CHO de la chaîne α du FcεRI humain et des chaînes β et γ du FcεRI de rat montrent en effet que ces différentes sous-unités peuvent s'associer et lier des IgE humaines [61]. Ainsi, lors de la transfection des cellules RBL 2H3 par la chaîne α du FcεRI humain, cette chaîne humaine est capable de s'associer aux sous-unités endogènes murines du FcεRI. L'assemblage $(\alpha)_{\text{hu}}(\beta\gamma)_{\text{rat}}$ peut alors lier les IgE humaines et rend possible une activation des cellules transfectées par des anticorps anti-IgE humaines ou par un

allergène auquel le patient allergique est sensibilisé. Les cellules RBL 2H3 humanisées ainsi activées libèrent de l'histamine ou d'autres médiateurs comme les leucotriènes, la sérotonine ou la β -hexosaminidase. Toutefois, l'association hétérogène du récepteur cumulée à un bas niveau d'expression de la chaîne α humaine dans ces cellules engendre une activation relativement faible. Les récepteurs de ces cellules sont en effet sous une forme trimérique $(\alpha)_{hu}(\gamma\gamma)_{rat}$, donc sans la chaîne β qui joue un rôle dans l'amplification du signal (introduction, paragraphe I.2.1.1.b) [67-69]. De plus, le niveau d'expression de la chaîne α par les cellules RBL 2H3 humanisées est d'environ 25 000 par cellule [344], niveau donc faible en comparaison des mastocytes humains qui expriment environ 100000 Fc ϵ RI par cellule.

Afin de pallier ces déficiences, d'autres lignées cellulaires exprimant, après transfection, les 3 chaînes du Fc ϵ RI humain ont été développées.

I.3. LA LIGNEE CELLULAIRE RBL SX-38

L'une d'elles, la lignée RBL SX-38, développée par JP Kinet [349] se caractérise par un niveau d'expression élevé du Fc ϵ RI humain (environ 130000 Fc ϵ RI par cellule) [350], niveau comparable à celui observé sur les mastocytes humains. L'association de la chaîne α humaine avec la chaîne β humaine, plus aisée que celle avec l'équivalent de rat, favorise la formation de récepteur sous forme complète lors de la transfection [351]. La fonctionnalité de la lignée cellulaire contenant le récepteur ainsi formé a pu être établie lors de tests de dégranulation spécifique [352]. L'utilisation de cette lignée cellulaire a permis de mettre en évidence des différences d'allergénicité entre des protéines purifiées [184].

Un des objectifs de ma thèse était d'adapter et d'améliorer ce modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique pour l'étude des sources allergéniques étudiées au laboratoire : le lait et l'arachide. Pour ce faire, les cellules RBL SX-38 nous ont été gracieusement fournies par JP Kinet et MH Jouvin (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, Etats-Unis). Cette première partie de la thèse sera donc consacrée au développement et à des exemples d'applications de ce modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Nous allons dans un premier temps présenter la mise au point, l'optimisation et la validation de ce modèle cellulaire. Pour cela, nous avons pu bénéficier d'une grande sérothèque constituée en collaboration avec le Service d'Allergologie

et de Pneumologie Pédiatriques de l'Hôpital Necker. Dans un second temps, nous verrons des applications réalisées non seulement dans le cadre de l'allergie à l'arachide mais aussi dans celle de l'allergie au lait de vache. Nous nous attacherons finalement à discuter des avantages et inconvénients d'un tel modèle cellulaire en fonction des résultats conjointement obtenus avec les deux sources allergéniques.

II. MATERIELS ET METHODES

Les réactifs utilisés proviennent essentiellement de chez Sigma (St Louis MO, USA). Les réactifs ayant une autre origine seront précisés dans le texte en fonction de leur implication.

II.1. PURIFICATIONS DES ALLERGENES DES LAITS DE VACHE ET DE CHEVRE ET DE L'ARACHIDE

Les purifications et caractérisations des allergènes du lait de vache, du lait de chèvre et de l'arachide sont réalisées au laboratoire.

II.1.1. Purification des allergènes des laits de vache et de chèvre

Les constituants les plus abondants des laits de vache et de chèvre ont été purifiés : le lactosérum et la fraction caséine entière, l' α -lac et la β LG, et les différentes caséines (α 1, α 2, β et κ). Ces purifications des allergènes du lait ont été réalisées selon les protocoles précédemment décrits [206;353]. Pour le lait de vache, elles comprennent une succession de précipitations et de chromatographies qui s'appuient sur les caractéristiques physico-chimique différentes des protéines du lait (figure 12). Le protocole de purification des protéines du lait de chèvre suit le même principe. Cependant, pour des raisons quantitatives, le protocole de purification des caséines à partir du lait de chèvre a été simplifié. Il n'incorpore pas de précipitations et ne comprend donc qu'une succession de chromatographies en échanges d'ions et en phase inverse (RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquide Chromatography)).

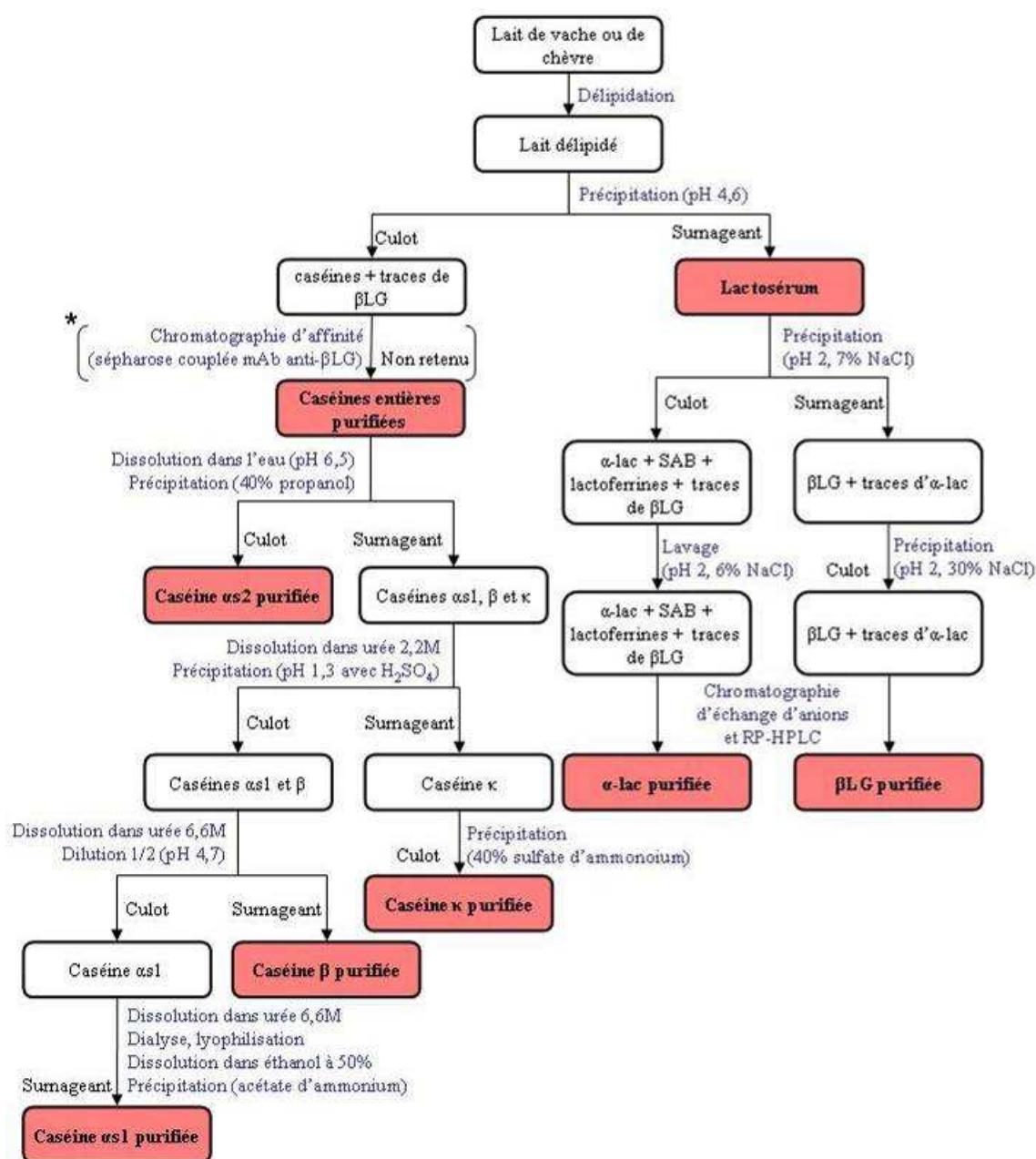


Figure 12 : Etapes de la purification des allergènes du lait de vache.

* Etape adoptée lors de la seule obtention de la caséine entière. Cette étape n'est pas appliquée pour la purification des différentes fractions de la caséine entière, les techniques chromatographiques permettant d'écarter tout risque de contamination par la βLG.

Les masses moléculaires (MM) des différents allergènes des laits de vache et de chèvre ont été déterminées au laboratoire par spectrométrie de masse MALDI-TOF : les valeurs obtenues, conformes aux données de la littérature, correspondent aux masses des variants de protéines les plus fréquents des laits de vache et de chèvre. Pour les protéines du lait de vache, les MM sont de : 18,36 kDa pour la βLG, 14,81 kDa pour l'α-lac, 23,6 kDa pour la caséine α1, 25,2 kDa pour la caséine α2, 24 kDa pour la caséine β et 19 kDa pour la

caséine κ . Pour la fraction de caséine entière, une MM moyenne de 23 kDa a été calculée en tenant compte des différentes proportions et masses moléculaires des protéines qui la composent. Pour les protéines du lait de chèvre, les MM sont de : 18,14 kDa pour la β LG, 23,35 kDa pour la caséine α s1, 25,6 kDa pour la caséine α s2, 23,85 kDa pour la caséine β et 19,43 kDa pour la caséine κ . Pour la fraction de caséine entière, une MM moyenne de 23 kDa a également été calculée.

La pureté des protéines purifiées a été vérifiée par techniques chromatographique et électrophorétique (figure 13).

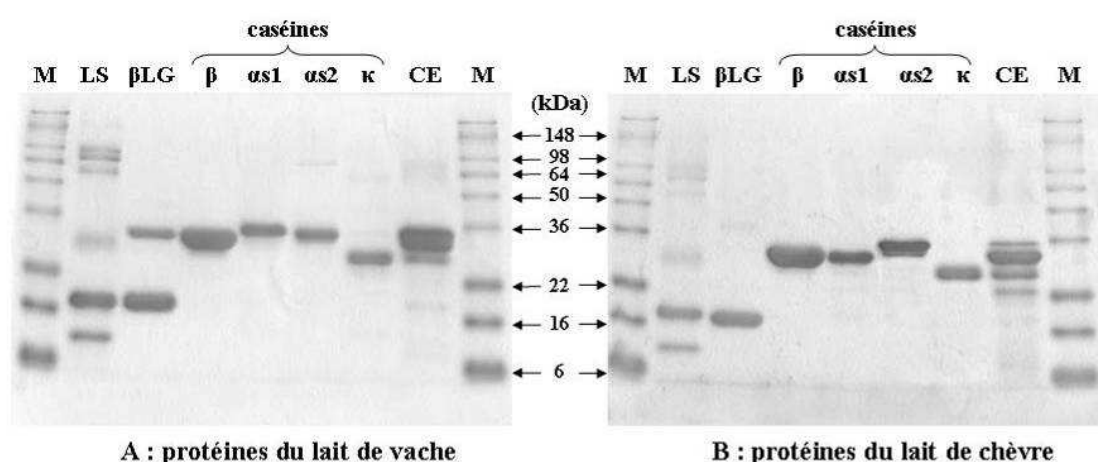


Figure 13 : Electrophorèse SDS-PAGE des allergènes du lait de vache (A) et de chèvre (B).

Electrophorèse réalisée sur un gel à 15% d'acrylamide, 10 μ g de protéines ont été déposées par puits.

(M : marqueur de poids moléculaire, LS : lactosérum, CE : caséine entière.)

L'électrophorèse permet de discerner la migration des différentes protéines des laits de vache et de chèvre. Toutefois, la migration des quatre différentes caséines est très proche du fait de leur MM similaires. Pour chacune des protéines purifiées, une seule bande est observée à l'exception de la β LG bovine qui en présente deux, correspondant aux formes monomérique et dimérique de cet allergène.

Des méthodes enzymo-immunologiques mises au point à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques de chaque protéine du lait ont confirmé leur identité et pureté (>95-99%).

II.1.2. Purification des allergènes de l'arachide

Différents allergènes de l'arachide ont été fractionnés et purifiés : l'extrait protéique brut d'arachide (EPBA) et les allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 et un produit d'hydrolyse de Ara h 3, dissocié des complexes de glycinines lors de la purification (fragment de Ara h 3). Ces purifications d'allergènes de l'arachide reposent sur des protocoles précédemment appliqués au laboratoire [163;315]. La démarche méthodologique est représentée figure 14. Elle comprend une succession d'extractions, de précipitations et de chromatographies. Là encore, les étapes tiennent compte des caractéristiques différentes des protéines de l'arachide. A titre d'exemple, Ara h 1 présente des sucres susceptibles de lier la Concanavaline A [354], permettant la mise en œuvre d'une chromatographie d'affinité.

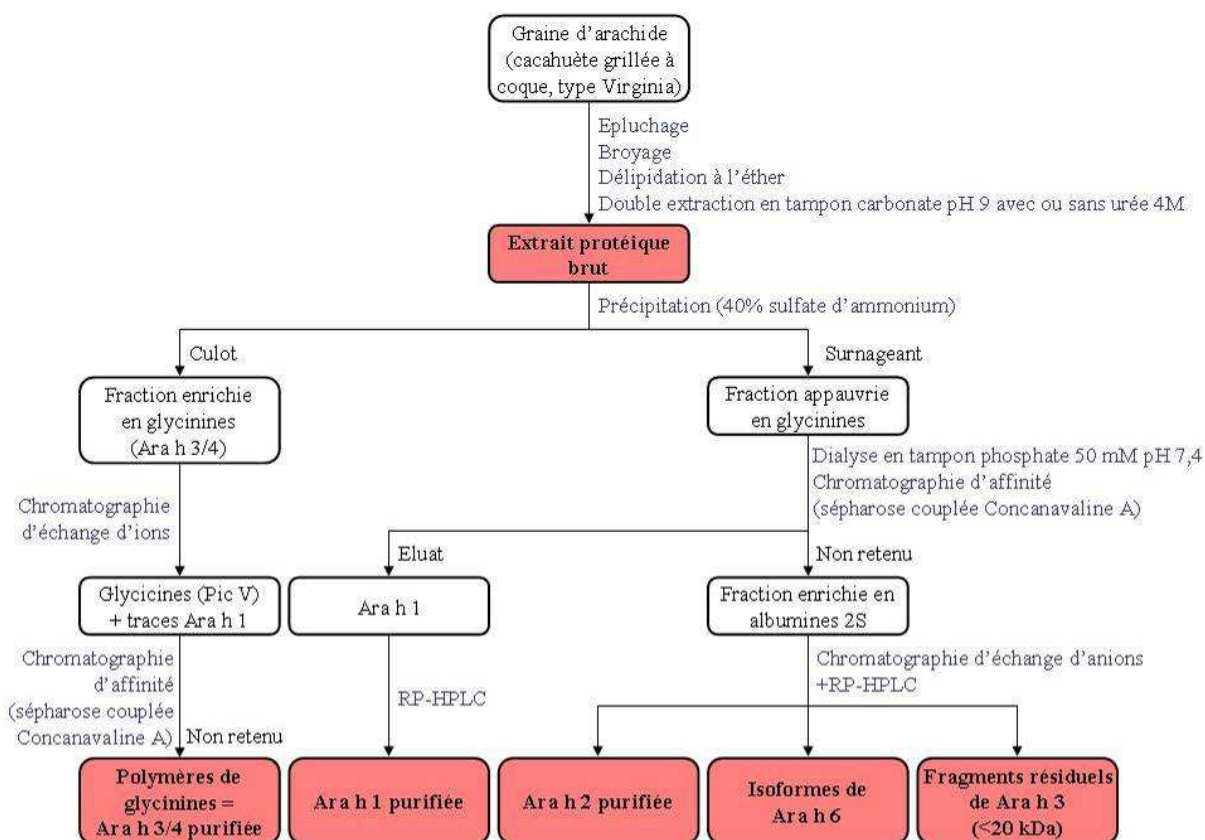


Figure 14 : Etapes de l'extraction et de la purification des allergènes de l'arachide.

Les MM des allergènes de l'arachide ont également été déterminées au laboratoire par spectrométrie de masse MALDI-TOF : les valeurs obtenues sont de 62,7 kDa pour l'Ara h 1, de 16,67 et 18,05 kDa pour les 2 isoformes naturelles d'Ara h 2, de 14,84 kDa pour l'Ara h 6

et de 11,9 kDa pour le fragment de Ara h 3 [162;163]. La MM de Ara h 3 est estimée à 130 kDa par chromatographie d'exclusion. Pour l'EBPA, une MM de 100 kDa a été calculée en tenant compte des différentes proportions et masses moléculaires des différentes protéines qui le composent [355].

La pureté des protéines purifiées a été vérifiée par techniques chromatographique et électrophorétique (figure 15).

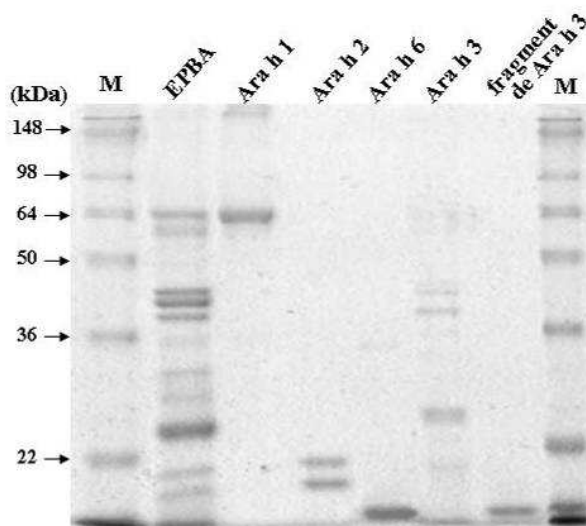


Figure 15 : Electrophorèse SDS-PAGE des allergènes de l'arachide.

Electrophorèse réalisée sur un gel à 12% d'acrylamide, 5 μ g d'EPBA et 1 μ g de protéines purifiées ont été déposées par puits.

(M : marqueur de poids moléculaire, EPBA : extrait protéique brut d'arachide).

L'électrophorèse permet de discerner la migration des différentes protéines de l'arachide. Pour Ara h 1, Ara h 6 et le fragment de Ara h 3, une seule bande est observée. Ara h 2 se présente sous la forme d'un doublet correspondant à ses deux isoformes. Ara h 3 correspond aux polymères de glycinines dont les MM s'étendent de 14 à 45 kDa.

II.2. SERUMS DE PATIENTS ALLERGIQUES

Les travaux présentés dans ce chapitre reposent sur une sérothèque constituée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Evelyne Paty (Service d'Allergologie et de Pneumologie Pédiatriques de l'Hôpital Necker (Paris)). Elle est composée de sérums de patients dont l'allergie à l'arachide ou au lait a été confirmée par une histoire clinique avérée et des manifestations cliniques objectives observées après exposition à l'aliment (tests cutanés et/ou tests de provocation orale). A l'origine, les patients ont été répartis en fonction de leur

symptomatologie selon la classification de Furlong et coll. qui distingue les symptomatologies sévères des symptomatologies légères ou modérées [356]. Les symptomatologies sévères se caractérisent par un choc anaphylactique, un angio-œdème ou par un tableau clinique impliquant trois appareils (dermique, digestif et respiratoire). Par opposition, les symptomatologies légères à modérées se caractérisent par un tableau clinique n'impliquant qu'un ou deux appareils, et sans manifestation extrême.

II.2.1. Sérums de patients allergiques à l'arachide

Afin notamment de réaliser la mise au point du modèle cellulaire mais également pour constituer un témoin positif dans les tests de dosages des IgE spécifiques réalisés en routine au laboratoire, un pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide représentatifs de la sérothèque a été constitué (29 filles et 47 garçons, médiane d'âge de 5,5 ans). Parmi ces patients, 24 ont une clinique sévère et constituent ainsi 30% des sérums sélectionnés. Par ailleurs, une analyse individualisée de 12 sérums de patients allergiques a été effectuée. Les sérums sélectionnés avaient été préalablement caractérisés au laboratoire en termes de concentrations en IgE totales et spécifiques de l'EPBA. Les informations concernant ces patients sont regroupées dans le tableau 6. Sept garçons et 5 filles constituent le groupe d'étude. La population choisie est composée d'enfants (la médiane est de 10 ans) avec une symptomatologie majoritairement sévère. Parmi ces 12 patients, 8 ont effectué un test de provocation. Les quantités déclenchantes sont généralement basses et inférieures à l'équivalent d'une graine d'arachide (environ 1 g).

Tableau 6 : Caractéristiques de 12 patients allergiques à l'arachide

n° du sérum	genre	âge (ans)	symptomatologie	Remarques
51	m	5	LM	TPO + à 400 mg
92	m	2,5	S	
200	f	9	S	TPO + à 100 mg
314	m	8	S	
437	m	15,5	S	TPO + à 400 mg
445	m	12,5	S	TPL +
470	m	4	LM	TPO + à 6 g
488	f	12	LM	urticaire ou vomissements, TPO + à 200 mg
577	f	16	S	TPO + à 200 mg
609	f	6,5	S	
631	f	16	S	
658	m	11	LM	2ème TPO fort

TPO : test de provocation orale, TPL : test de provocation labiale, S : sévère, LM : légère à modérée.

II.2.2. Sérums de patients allergiques au lait

Les sérums utilisés ont été sélectionnés à partir de deux populations distinctes d'allergiques au lait. Un premier groupe correspond à des enfants allergiques au lait de vache et sensibilisés aux protéines de chèvre et de brebis. Un second groupe comprend des patients allergiques aux laits de chèvre et de brebis qui tolèrent les produits laitiers de vache (BCB26 et BCB96) (tableau 7).

Ces sérums, rares et précieux, n'ont été utilisés que dans les applications et non dans la mise au point / validation du test cellulaire.

Tableau 7 : Caractéristiques des patients allergiques au lait.

n° du sérum	genre	âge (ans)
BCB26	m	6
BCB28	f	
BCB29	f	5
BCB69	m	
BCB77	f	
BCB83	m	4
BCB96	m	8
BCB100	m	
BCB116	f	14

Un pool de 10 sérums de patients allergiques au lait et non sensibilisés aux allergènes de l'arachide a été constitué afin de servir de témoin de spécificité lors du test cellulaire utilisé dans le cadre de l'allergie à l'arachide.

II.3. DOSAGES ENZYMO-IMMUNOLOGIQUES DES IgE

TOTALES ET DES IgE SPECIFIQUES ET DOSAGE DES

COMPLEXES IgE-IgG PRESENTS DANS LES SERUMS

Les concentrations en IgE totales sont mesurées par un test immunométrique qui a été développé au laboratoire à l'aide d'un couple complémentaire d'anticorps monoclonaux anti-IgE humaines [357]. Le dosage a pour principe l'adsorption sur plaque de microtitration d'un premier anticorps anti-IgE humaine (clone LE27) et l'utilisation d'un second anticorps traceur anti-IgE (clone BS17) couplé à la forme tétramérique de l'Acétylcholinestérase (AChE), appelée « G4 » [358]. L'activité enzymatique fixée sur la phase solide est alors révélée par la réaction colorimétrique d'Ellman [359]. La quantification est effectuée à l'aide d'une gamme de concentration d'un standard IgE (WHO/IUIS).

Les titres en IgE spécifiques des allergènes purifiés du lait de vache et de chèvre et de l'arachide sont mesurés à l'aide d'un EAST (Enzyme Allergo Sorbent Test) qui a également été développé au laboratoire [232;360]. Pour ce dosage, l'allergène est passivement adsorbé sur la phase solide (plaque de microtitration) et après incubation avec les sérums, le traceur utilisé est le même que pour le dosage des IgE totales. Pour le dosage des complexes IgE-IgG (IgG anti-IgE) présents dans les sérums, les mêmes principes de dosage ont été adaptés et utilisés. Les IgE sériques sont capturées sur une plaque revêtue par l'anti-IgE humaine LE27, et après incubation avec les sérums, les traceurs utilisés sont des anticorps anti-IgG humaines couplés à la G4.

II.3.1. Matériels et tampons utilisés

II.3.1.1. Matériels d'immunoanalyse utilisés

Les plaques de microtitration (96 puits) utilisées pour les dosages sont des plaques Nunc Immunoplate MaxiSorp (Roskilde, Danemark) permettant une adsorption optimale des

protéines (anticorps ou allergènes). Les lavages, distributions et mesures de l'absorbance sont réalisés grâce à des équipements spécialisés de chez Labsystems (Helsinki, Finlande).

II.3.1.2. Tampons utilisés

Les tampons utilisés pour les dosages enzymo-immunologiques sont :

- le **tampon d'immobilisation** des protéines sur phase solide : tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4.
- le **tampon EIA** : tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,4 contenant 0,15 M de NaCl, 0,01% d'azoture de sodium et 0,1% de SAB. Ce tampon est utilisé pour saturer les plaques et pour les dilutions des sérums et des traceurs enzymatiques.
- le **tampon de lavage** : tampon phosphate de potassium 10 mM pH 7,4 contenant 0,05 % de Tween 20.
- le **réactif d'Ellman** : tampon phosphate de potassium 100 mM contenant 14,5 mM de NaCl, 0,75 mM d'iodure d'acétylthiocholine et 0,25 mM de DTNB (acide 5,5'dithiobis-(2-nitrobenzoïque)). Ce réactif est le substrat de l'AChE. Le produit final de la réaction enzymatique, le DTNB réduit, est détecté par mesure de l'absorbance à 414 nm.

II.3.2. Préparation des plaques de microtitration avec l'anticorps ou l'antigène immobilisé

Plusieurs types de plaques, correspondant aux différents anticorps ou antigènes immobilisés sont préparés. Pour le dosage des IgE totales et des complexes IgE-(IgG anti-IgE), l'anticorps monoclonal anti-IgE humaines (clone LE27 [357]) est immobilisé par adsorption passive sur des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Pour le dosage des IgE spécifiques du lait ou de l'arachide, chacun des extraits bruts ou des allergènes purifiés sont adsorbés sur plaque Maxisorp.

Cent microlitres par puits d'une concentration d'antigène ou d'anticorps à 5 µg/mL sont déposés. Après incubation pendant 24 h à 4°C, les plaques sont lavées puis saturées par ajout de 300 µL par puits de tampon EIA. Les plaques sont alors scotchées puis conservées à 4°C. Elles peuvent ainsi être conservées plusieurs mois sans perte de réactivité.

II.3.3. Préparation des traceurs

Tous nos dosages impliquent un traceur enzymatique élaboré à partir de la forme tétramérique de l'AChE (G4). Cette enzyme présente notamment une très forte activité catalytique et une insensibilité à certains agents anti-bactériens tel que l'azoture. Les traceurs sont préparés au laboratoire selon la méthode décrite par Grassi et coll. [358]. Le couplage résulte de la réaction entre les thiols des fragments Fab' des anticorps, obtenus par protéolyse enzymatique modérée, avec la G4 préalablement dérivatisée au SMCC (N succimidyl-4-N-(N-maléimide-méthyl)-cyclohexane-1-carboxylate). L'activité est exprimée en Unités Ellman par mL (UE/mL). Les anticorps qui ont ainsi été couplés à la G4 sont un anticorps monoclonal anti-IgE humaines (clone BS17) et des anticorps anti-IgG humaines spécifiques des différentes sous-classes d'IgG1, 2, 3 et 4. Les clones utilisés pour les traceurs anti-IgG sont les suivants : anti-IgG1 (JDC-1, Southern Biotechnology Associates, Inc.), anti-IgG2 (HP6002, Southern Biotechnology Associates, Inc.), anti-IgG3 (HP6047, Sigma), anti-IgG4 (20G/5C7, Biotools international).

Une autre forme de traceur utilisée consiste à coupler un antigène avec la G4 par réaction entre une fonction thiol introduite sur les amines libres de la protéine et la G4 dérivatisée au SMCC. Les protéines qui ont ainsi été couplées à la G4 sont les différents allergènes purifiés de l'arachide Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 et le fragment de Ara h 3.

II.3.4. Dosages enzymo-immunologiques des anticorps présents dans les sérums

II.3.4.1. Dosage des IgE totales

Le dosage des IgE totales est un dosage quantitatif, dans lequel les concentrations exprimées en UI/mL sont déterminées par rapport une gamme étalon. Des plaques revêtues par l'anticorps anti-IgE humaines (clone LE27) sont lavées avec le tampon de lavage (cycle de 5 lavages). Cinquante microlitres par puits de sérums humains dilués en tampon EIA (de 5 en 5, allant du 1/20 au 1/2500), ou de standard, sont déposées en duplicat. La gamme standard est réalisée avec le standard IgE humaine pour des concentrations allant de 10 UI/mL à 0,08 UI/mL. Après mise en contact pendant 24 h à 4°C, les plaques sont lavées (cycle de 5

lavages) avec le tampon de lavage puis le traceur BS17-G4 est ajouté à raison de 50 μ L par puits, à la concentration de 2 UE/mL. Après 18 h à 4°C, les plaques sont lavées (2 cycles de 5 lavages entrecoupés par une agitation pendant 5 min dans du tampon de lavage). Deux cents microlitres de réactif d'Ellman sont alors déposés dans chaque puits et les mesure de l'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 414 nm à différents temps.

II.3.4.2. Détection des IgE spécifiques

II.3.4.2.a. Dosage par immobilisation de l'allergène

Le dosage des IgE spécifiques est d'ordre semi-quantitatif du fait de l'absence d'étalon interne. Le principe est le même que pour le dosage des IgE totales excepté que les sérums sont incubés sur des plaques revêtues par l'antigène d'intérêt. Les sérums sont dilués en série, à partir du 1/4. Le traceur utilisé est le même que pour le dosage des IgE totales (BS17-G4) et les résultats sont calculés en fonction d'une gamme standard réalisée simultanément sur une plaque revêtue par l'anticorps anti-IgE humaine LE27. Les valeurs obtenues avec des sérums témoins, issus de patients non allergiques, servent de contrôle négatif. De même, un second contrôle est effectué en mesurant le signal obtenu avec les sérums sur une plaque sans allergène et saturée en EIA.

II.3.4.2.b. Détection par capture d'IgE

Dans le dosage par immobilisation de l'allergène, différents aspects tels que les modifications structurales induites par l'adsorption de la protéine ou les interactions possibles avec les IgG spécifiques, peuvent influencer la liaison des IgE à l'allergène. Un second schéma de test a donc été mis au point au laboratoire, dont le principe repose sur la capture des IgE. Des anticorps anti-IgE sont adsorbés sur plaque et, après dépôt du sérum dilué et lavage de la plaque écartant la fraction IgG, les IgE spécifiques fixées sont déterminées à l'aide de l'allergène couplé à l'enzyme.

Plus en détails, des plaques revêtues par l'anticorps anti-IgE humaine LE27 sont lavées avec le tampon de lavage (cycle de 5 lavages). Quatre dilutions (50 μ L par puits, dilués de 5 en 5 en allant du 1/4 au 1/500) de chaque sérum sont alors incubées pendant 18 h à 4°C. Après lavage de la plaque (cycle de 5 lavages), l'antigène marqué à la G4 est déposé (50 μ L par puits, à 2 UE/mL). Après 4 h de réaction à température ambiante, les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages) et 200 μ L de réactif d'Ellman sont déposés dans chaque puits. La mesure

de l'absorbance est alors effectuée à une longueur d'onde de 414 nm. Les valeurs obtenues avec des sérums témoins (patients non allergiques) servent de contrôle négatif.

II.3.4.3. Dosage des complexes IgE-IgG

Le dosage des complexes IgE-IgG est réalisé par capture des IgE à l'aide d'un anticorps anti-IgE immobilisé et par la révélation des complexes fixés sur la phase solide à l'aide d'un anticorps anti-IgG couplé à l'ACHé. Les traceurs utilisés sont un traceur anti-IgG₁-G4 à 6 UE/mL et les traceurs anti-IgG_{2, 3} ou 4-G4 à 3 UE/mL. Afin de comparer les taux de complexes IgE-IgG d'un sérum à l'autre, les sérums sont dilués à une concentration fixée en IgE (5, 1 ou 0,2 UI/mL).

II.4. MODELE CELLULAIRE

Les cellules RBL 2H3 nous ont été gracieusement fournies par Ulrich Blank (Inserm, Unité E-0225, faculté de médecine Xavier-Bichat, Paris, France).

Les cellules RBL SX-38 utilisées pour la dégranulation après activation par les IgE humaines nous ont été gracieusement fournies par Jean-Pierre Kinet et Marie-Hélène Jouvin (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, Etats-Unis). La majorité des produits de culture cellulaire proviennent de chez Gibco (Invitrogen Ltd, Paisley, Royaume-Uni). Les produits aux provenances particulières seront cités dans le texte. Les boîtes de Pétri et les plaques de culture proviennent de chez Corning et les cellules sont incubées dans un incubateur Thermo Scientifique à 37°C, sous 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

II.4.1. Conditions de culture des cellules RBL SX-38 et RBL 2H3

II.4.1.1. Milieu de culture

Les cellules RBL sont des cellules adhérentes. Elles sont cultivées en boîtes de Pétri comme décrit par Wantke et coll. [350] dans un milieu de culture composé de milieu EMEM (Eagle's minimum essential medium with Earle's salts) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (chauffé 30 min à 56°C), 100 U de pénicilline, 100 µg/mL de

streptomycine et 2 mM de L-glutamine (milieu complet). Pour les cellules RBL SX-38, une pression de sélection est maintenue en ajoutant 2,4 mg/mL de généticine G418 (Sigma).

II.4.1.2. Repiquage des cellules

Quand elles arrivent à pré-confluence, les cellules sont repiquées. Elles sont d'abord rincées au PBS puis maintenues 3 minutes à 37°C en présence de trypsine et d'EDTA (trypsine 0,25%, 1 mM EDTA) pour les décoller. Elles sont ensuite mises en suspension avec du milieu de culture pour neutraliser la trypsine puis centrifugées (400 g, 5 min, 4°C). Le culot cellulaire est repris en milieu de culture complet. Les cellules RBL SX-38 sont repiquées 2 fois par semaine, selon leur croissance, par dilution du 1/10 au 1/20 ; les cellules RBL 2H3 sont quant à elles repiquées à la même fréquence par dilution du 1/15 au 1/30. Les cellules sont repiquées 20 fois environ avant d'être remplacées par un autre lot.

II.4.1.3. Numération et détermination de la viabilité cellulaire

Les numérations cellulaires sont réalisées en hémacytomètre (cellule de Malassez). La viabilité cellulaire est évaluée par coloration au bleu trypan (colorant d'exclusion, Sigma).

II.4.1.4. Congélation/décongélation

Après lavage au PBS, les cellules sont décollées comme préalablement décrit, dénombrées et, après centrifugation, le culot cellulaire est repris en SVF contenant 5% de DMSO (Sigma). La concentration cellulaire est ajustée à $3 \cdot 10^6$ cellules viables/mL et 1 mL de suspension cellulaire par cryotube est congelé à -20°C avant d'être transféré à -80°C puis conservé dans de l'azote liquide. Les cellules peuvent être ainsi conservées plusieurs mois.

Pour la décongélation, le contenu cellulaire d'un cryotube est rapidement repris dans du milieu chaud (37°C). Après un lavage, les cellules sontensemencées en boîte de culture (diamètre = 10 cm) dans du milieu de culture contenant 20% de SVF et sans G418. Une fois que les cellules adhèrent, elles sont repiquées comme décrit précédemment en présence de G418. Avant leur utilisation pour des tests de dégranulation, les cellules RBL SX-38 sont repiquées au moins 3 fois en présence de généticine pour induire une pression de sélection.

II.4.1.5. Sous-clonage par dilutions limites

Les cellules RBL SX-38 sont sélectionnées afin d'isoler un clone présentant une forte capacité de dégranulation et d'adhésion. Pour cela, les cellules ont été diluées à 1 cellule/mL puis ensemencées en plaque 96 puits à raison de 100 μ L par puits. Les clones isolés ont ensuite été repiqués, amplifiés et après sélection, les clones d'intérêt ont été congelés.

II.4.2. Expression du récepteur aux IgE humaines par les cellules RBL SX-38

L'expression du Fc ϵ RI par les cellules RBL SX-38 est contrôlée après chaque décongélation et au bout d'une vingtaine de repiquages des cellules afin de s'assurer de la stabilité de la lignée. L'expression de la chaîne α est contrôlée par technique de cytométrie en flux et celle de la chaîne β par technique d'immunoempreinte. Du fait de l'indisponibilité commerciale d'anticorps anti-chaîne γ du Fc ϵ RI humain, son expression n'a pas été vérifiée.

II.4.2.1. Contrôle de l'expression de la chaîne α du Fc ϵ RI humain par cytométrie en flux

Après incubation successive des cellules avec un anticorps monoclonal de souris anti-chaîne α du Fc ϵ RI humain, puis avec un anticorps secondaire marqué à un fluorophore (Fluorescéine Iso Thio Cyanate (FITC)), les cellules sont analysées en cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton-Dickinson). Différents paramètres sont ainsi mesurés pour les cellules : leur taille, leur granulométrie et l'intensité de fluorescence correspondant à la densité de surface de la chaîne α du Fc ϵ RI humain.

Des cellules RBL SX-38 et des cellules RBL 2H3 (servant de contrôle négatif) pré-confluentes sont lavées en PBS et sont ensuite incubées pendant 45 min à 4°C avec une solution de dissociation (PBS contenant 0,02% d'EDTA) et les cellules sont délicatement décollées par pipetage modéré. Après centrifugation (400 g, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est repris en PBS. Les cellules sont ensuite comptées sur cellules de Malassez et le volume de PBS est ajusté afin d'obtenir une concentration de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/mL. Après une nouvelle centrifugation (400 g, 5 min, 4°C), 100 ng de l'anticorps primaire sont ajoutés au culot cellulaire (100 μ L par tube, dilué en solution de lavage (PBS contenant 1% de SAB)). Un

marquage est réalisé avec un anticorps monoclonal de souris anti-chaîne α du Fc ϵ RI humain, (clone AER37, eBioscience) et en parallèle, un contrôle isotypique est réalisé avec un anticorps de souris de même isotype (IgG2b). Les suspensions cellulaires sont homogénéisées puis incubées pendant 1 h à 4°C. Après 3 lavages en solution de lavage, le culot cellulaire est repris par 100 μ L de l'anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de souris conjugué à la FITC (F(ab')₂ goat anti-mouse IgG (H+L) – FITC, Jackson ImmunoResearch), 5 μ g/mL en solution de lavage). Après 1 h d'incubation, à 4°C, à l'obscurité, les cellules sont lavées. Les cellules sont finalement reprises dans 500 μ L de FACS-flow (BD Bioscience).

Les cellules sont analysées en cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson). Les réglages du cytomètre sont paramétrés en fonction du contrôle isotypique réalisé avec les cellules RBL SX-38. Les résultats sont exprimés par le pourcentage de cellules positives et/ou par la moyenne de l'intensité de fluorescence mesurée. Les résultats peuvent également être exprimés selon le rapport d'intensité de fluorescence (RFI) entre les cellules marquées par l'anticorps anti-chaîne α du Fc ϵ RI humain et les cellules marquées par l'anticorps contrôle isotypique.

II.4.2.2. Contrôle de l'expression de la chaîne β du Fc ϵ RI humain

L'expression de la chaîne β du Fc ϵ RI a également été mesurée par technique de cytométrie en flux. Le protocole est le même que précédemment à l'exception d'une étape de perméabilisation des cellules préalable aux marquages. Elle est effectuée car l'épitope reconnu par l'anticorps anti-chaîne β du Fc ϵ RI humain est intracellulaire. Cette perméabilisation des cellules est réalisée en incubant 30 min à 4°C les cellules avec 500 μ L de PBS contenant 1% de Triton X-100 suivi de deux cycles de lavage. L'anticorps primaire de marquage est un anticorps polyclonal de lapin anti-chaîne β du Fc ϵ RI humain (Upstate biotechnology) dilué au 1/1000 et l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la FITC (F(ab')₂ goat anti-rabbit IgG (H+L) – FITC, Jackson ImmunoResearch) dilué à 5 μ g/mL.

L'expression de la chaîne β est confirmée par immunoempreinte : des lysats cellulaires réalisés à partir des cellules RBL SX-38 et, en contrôle, des cellules RBL 2H3, sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE. Après transfert des protéines du gel sur une

membrane, la bande correspondant à la chaîne β du Fc ϵ RI humain est révélée par incubation avec un anticorps polyclonal de lapin spécifique de cette sous unité humaine.

- **Lyse des cellules et dosage protéique** : les cellules RBL SX-38 ou RBL 2H3 pré-confluentes sont lysées avec du tampon Laemmli sans β -mercaptoéthanol et sans bleu de bromophénol (tampon Tris 62,5 mM pH 6,8 contenant 1% de SDS et 10% de glycérol). Les échantillons sont alors dilués en tampon de phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 pour le dosage protéique effectué grâce au kit BCA (Pierce), selon les instructions du fournisseur.
- **Electrophorèse SDS-PAGE** : après addition de β -mercaptoéthanol (2,5%) et de bleu de bromophénol (0,0025%), les échantillons sont chauffés pendant 10 min à 95°C. Cinq microgrammes de protéines sont déposés par puits de migration et séparés par électrophorèse SDS-PAGE avec un système vertical Mini Protean III (Biorad) suivant la méthode de Laemmli [361] modifiée par Dean et coll. [362]. Les protéines des extraits sont séparées sur des gels de migration constitués de 12% d'acrylamide. Un gel de pré-concentration (Stacking-gel) à 5% d'acrylamide est coulé au-dessus du gel à 12%. Le marqueur de masse moléculaire utilisé couvre une gamme variant de 4 kDa à 148 kDa (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). La migration s'effectue en tampon composé de 25 mM de Tris pH 8,3 et contenant 0,1% de SDS et 192 mM de glycine. L'intensité imposée est de 15 mA/gel, jusqu'à ce que le front de migration passe le gel de pré-concentration, puis de 30 mA/gel pendant le reste de la migration. Deux gels de migration sont réalisés en parallèle. Un des gels est révélé par coloration au bleu de coomassie G-250 suivant les instructions données par le fournisseur (GelCode® Blue Stain Reagent, Pierce). L'autre gel est utilisé pour réaliser l'immunoempreinte.
- **Transfert sur membrane et immunoempreinte** : immédiatement après l'électrophorèse, le gel est équilibré dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 10%) pendant 15 min. Le transfert des protéines sur membrane PVDF (PolyVinylDiFluoride) s'effectue grâce à un champ électrique de 36 V pendant 90 min dans le tampon de transfert. La membrane contenant les protéines transférées est ensuite saturée par incubation avec du tampon TBST (tampon TBS (Tris 20 mM, NaCl 250 mM) contenant 0,5% de Tween 20) auquel est ajouté 5% (m/v) de lait écrémé en poudre (TBST-lait) permettant de bloquer tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane. La membrane est ensuite incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin anti-chaîne β du Fc ϵ RI humain, Upstate biotechnology) dilué au 1/10000. Après 3 lavages de 15 min avec le tampon TBST-lait, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps de chèvre

anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase ; peroxydase conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/25000 pendant 2 h. La membrane est ensuite rincée (2 lavages de 15 min) avec le tampon TBST puis avec le tampon TBS (2 lavages de 15 min). L'activité de la peroxydase est révélée par incubation pendant 1 min avec une solution contenant du luminol selon les instructions du fournisseur (ECL West Dura Trial Kit, Pierce). Un film photographique est alors apposé sur la membrane (X-OMAT, Kodak), puis développé.

II.4.3. Test de dégranulation

Le test de dégranulation a été adapté de Dibbern et coll. et Hoffmann et coll. [352;363]. Il se déroule en 4 étapes : l'ensemencement, la sensibilisation, l'activation et le dosage d'un des médiateurs libérés, marqueur de la dégranulation. Ces étapes sont schématisées figure 16. Au cours de la mise au point du test cellulaire de dégranulation, les paramètres de ces différentes étapes ont été optimisés.

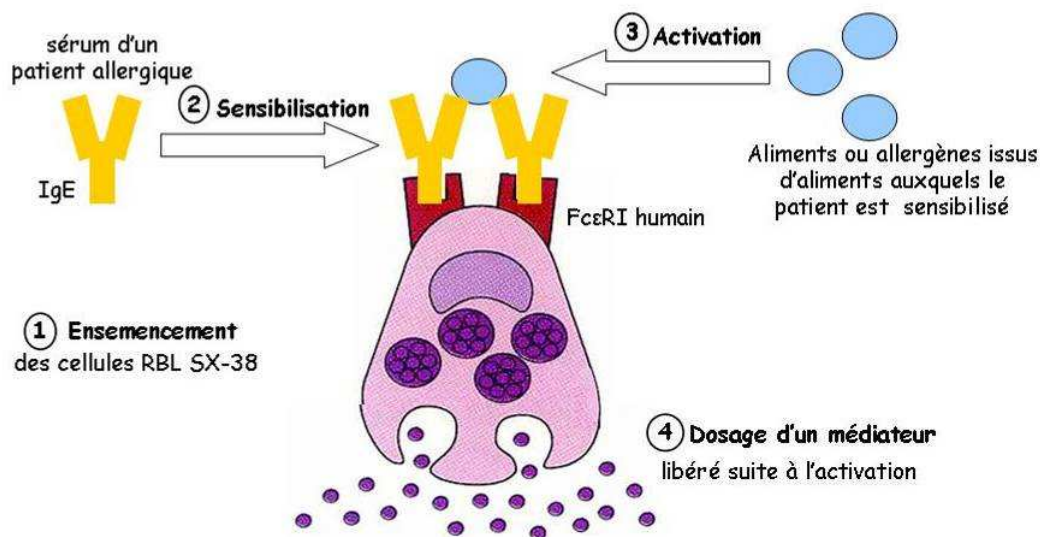


Figure 16 : Principe du test cellulaire de dégranulation.

II.4.3.1. Ensemencement des cellules

Le premier jour, des cellules RBL SX-38 pré-confluentes sont décollées selon le même protocole que pour le repiquage des cellules (paragraphe II.4.1.2). Les cellules sont

ensemencées sur des plaques de culture 96 puits dans du milieu de culture complet sans G418. Elles sont ensuite mises en culture pendant 24 h. Afin d'optimiser le nombre de cellules par puits, 8000, 10000 ou 12000 cellules ont étéensemencées par puits, diluées dans un volume de 100 μ L de milieu.

II.4.3.2. Sensibilisation passive des cellules

Les cellules sont lavées au PBS, puis elles sont incubées avec des sérums de patients allergiques dilués dans du milieu de culture sans SVF.

Quatre paramètres de cette étape ont été étudiés :

- **La quantité d'IgE optimale** pour sensibiliser les cellules : des dégranulations ont été réalisées en sensibilisant les cellules par des gammes de concentration en IgE totales de différents sérums allant de 30 UI/mL à 1,6 UI/mL, par dilutions de 2 en 2.
- **Le volume réactionnel** pour la sensibilisation : les sérums ont été dilués dans 50, 100 ou 200 μ L de milieu de culture sans SVF.
- **La durée d'incubation** des IgE avec les cellules : les IgE ont été incubées avec les cellules pendant 6, 18, 24 ou 40 h.
- **Le prétraitement des sérums** avant la sensibilisation des cellules RBL SX-38. L'effet sur la capacité de dégranulation de différents prétraitements des sérums a été testé :
 - *Pré-incubation sur cellules RBL 2H3* : Des cellules RBL-2H3 sontensemencées dans des plaques de culture de 96 puits à raison de $1,2 \cdot 10^5$ cellules/mL et de 100 μ L par puits en milieu de culture complet. Après 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C, les cellules sont lavées au PBS. Cent microlitres par puits de sérum dilué à 10 UI/mL d'IgE totales dans du milieu de culture sans SVF sont ensuite ajoutés. Après 2 h d'incubation à 37°C, les sérums sont collectés puis transférés sur les cellules RBL SX-38.
 - *Chauffage* : Les sérums sont chauffés pendant 5 min à 56°C puis dilués à 10 UI/mL d'IgE totales pour sensibiliser les cellules RBL SX-38. Des sérums dilués au 1/2 avec du glucose 4 M puis chauffés pendant 45 min à 56°C ont également été testés [364].
 - *Epuisement des sérums en IgG par passage sur protéine G* : La protéine G est décrite pour sa faible affinité pour les IgE humaines et sa forte affinité pour les IgG humaines [365]. Le gel utilisé (ProSep, Millipore) est rincée par 10 volumes de tampon d'adsorption (tampon PBS pH 7,4 contenant 0,5 M de NaCl). Après centrifugation (3 min, 3000 g, 4°C), la protéine G est reprise par 2 volumes de tampon d'adsorption et est répartie en tubes eppendorf (500 μ L

par tube). Après centrifugation (3 min, 3000 g, 4°C), le surnageant est éliminé. Les sérums dilués au 1/5 en tampon d'adsorption sont ensuite ajoutés sur la protéine G. Après 1 h sous agitation douce à 20°C, le tube est centrifugé (3 min, 3000 g, 4°C) et le surnageant, fraction déplétée en IgG, est prélevé.

- *Immunopurification des IgE* : La purification des IgE des sérums humains est réalisée par chromatographie d'affinité. Le principe repose sur la liaison des IgE humaines à des anticorps anti-IgE humaines greffés à un support solide. Les IgE vont être sélectivement retenues sur le support tandis que les autres constituants des sérums restent dans la solution non retenue. Après lavage, un changement de pH permet ensuite d'éluer les IgE fixées sur le gel.

Un mélange équimolaire des anticorps monoclonaux anti-IgE humaines BS17 et LE27 est couplé à de la CNBr-activated SepharoseTM 4B (Amersham Biosciences) selon les instructions du fournisseur. Le gel est ensuite conservé à 4°C dilué au 1/5 en tampon de lavage (tampon phosphate de sodium 20 mM contenant 0,4 M de NaCl et 0,1% de SAB, pH 8) auquel est ajouté 0,01% d'azoture de sodium. Avant utilisation, le gel est lavé 3 fois par suspension du gel dans 5 volumes de tampon de lavage, centrifugation (500 g, 5 min, 20°C), et prélèvement du surnageant. Pour réaliser l'immunopurification des IgE de sérums humains, 400 µL de suspension du gel dans le tampon de lavage (80 µL de gel) sont transférés dans un tube eppendorf. Après centrifugation, le tampon de lavage est retiré et 100 µL de sérum dilué au 1/4 en tampon de lavage sont ajoutés. Le gel est alors incubé avec le sérum sous agitation rotationnelle à 20°C pendant 4 h. Après centrifugation, la fraction non retenue est collectée. Deux cycles de lavage sont ensuite effectués et les IgE sont éluées par addition successive de 3 x 200 µL de tampon glycine 0,1 M contenant 0,4 M de NaCl et 0,1% de SAB, pH 3. Après centrifugation (800 g, 1 min, 20°C), l'éluat acide est rapidement neutralisé par ajout de soude 2 M.

II.4.3.3. Activation des cellules

Après incubation avec les IgE, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon NaPIPES (NaPIPES 20 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,4 mM, CaCl₂ 1 mM, glucose 5,6 mM et 0,1% de SAB, pH 7). Le dernier lavage est réalisé par une incubation sous agitation modérée (150 rpm) de 15 min avec le tampon NaPIPES. Les différents activateurs sont ensuite incubés en duplicat (50 µL/puits, dilués dans du tampon NaPIPES) à 37°C sous agitation (150 rpm) (incubateur INFORS, Bottmingen, Suisse). Ces activateurs correspondent

à des gammes de concentrations en allergènes du lait de vache ou d'arachide, dilués de 10 en 10. La durée d'activation par ces allergènes est de 5, 15, 45 ou 60 min.

Des contrôles sont réalisés systématiquement pour chaque sérum :

- *la dégranulation basale* est mesurée en activant les cellules sensibilisées avec le tampon NaPIPES seul
- *le contenu total en β -hexosaminidase* est mesuré par lyse des cellules avec du Triton X-100 (1% final)
- *la dégranulation de référence, IgE-dépendante*, est mesurée en provoquant artificiellement le pontage des IgE à l'aide d'anticorps anti-IgE humaines. A cette occasion, trois anticorps anti-IgE humaines différents ont été comparés pour déterminer la dégranulation de référence. Les différents anticorps anti-IgE humaines testés sont les anticorps monoclonaux de souris LE27 et BS17 et un anticorps commercial polyclonal de chèvre (clone STAR96, Serotec). Des gammes de concentrations ont été réalisées de 50 à 50000 ng/mL pour chacun de ces anticorps.

II.4.3.4. Dosage des médiateurs libérés

L'intensité de la dégranulation est estimée à l'aide du dosage, dans le surnageant, de deux médiateurs : l'histamine et la β -hexosaminidase.

Le dosage de l'histamine est réalisé avec le kit Histamine EIA de chez SPI-BIO/Bertin (Montigny-le-Bretonneux, France) selon les instructions fournies par le fournisseur. C'est un test de dosage enzymatique par compétition qui requiert une étape préalable de dérivatisation chimique des échantillons.

Le dosage enzymatique de la β -hexosaminidase est réalisé selon la méthode décrite par Hoffmann et coll. [363]. Il repose sur une réaction colorimétrique enzymatique avec son substrat, le p-nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminide libérant du p-nitrophénol. Après changement du pH du milieu, sa base conjuguée, l'ion p-nitrophénolate absorbe à 405 nm. Après l'activation des cellules, les surnageants de culture sont donc transférés sur une plaque 96 puits (Greiner, 30 μ L par puits) puis 50 μ L d'une solution contenant du p-nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (1,3 mg/mL dans du tampon acide citrique 0,1 M pH 4,5) sont ajoutés. La plaque est alors incubée à 37°C sous agitation (150 rpm) pendant 1 h. La réaction est alors arrêtée par ajout de 100 μ L de tampon glycine 0,2 M, pH 10,7 et l'absorbance est mesurée à 405 nm.

II.4.3.5. Contrôles réalisés lors des tests de dégranulation

Un premier contrôle effectué avec une protéine animale, l'albumine sérique humaine, n'a pas engendré de dégranulation significative après sensibilisation des cellules par des IgE de patients allergiques à l'arachide ou au lait (non montré).

Par ailleurs, la spécificité de la dégranulation induite par les différents allergènes testés est vérifiée en réalisant une dégranulation dans les mêmes conditions expérimentales avec des sérums individuels ou pools de sérums de patients ayant une autre allergie alimentaire. L'absence d'IgE spécifiques de l'allergène à tester dans ces sérums est vérifiée dans les deux formats de dosage disponibles au laboratoire (EAST et dosage par capture des IgE). Dans le cas de l'étude des allergènes du lait, ce sont donc des sérums de patients allergiques à l'arachide et non sensibilisés au lait qui sont utilisés. Pour l'étude des allergènes de l'arachide, pour des raisons de volumes de sérums disponibles, un pool de 10 sérums de patients allergiques au lait et non sensibilisés à l'arachide est utilisé (paragraphe II.2.2).

Un contrôle interne est réalisé sur chaque plaque dans les mêmes conditions expérimentales en sensibilisant les cellules avec le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. Les dégranulations basale, totale et de référence sont déterminées à chaque expérience.

II.4.3.6. Expression des résultats

Les résultats des dégranulations de mastocytes sont exprimés, lors du dosage de la β -hexosaminidase, en mA à 405 nm, puis rapportés aux signaux obtenus lors des dégranulations totales ou de référence.

- La dégranulation basale est exprimées directement en fonction du contenu total en β -hexosaminidase :

$$\text{dégranulation basale} = \frac{mDO(\text{tampon seul})}{mDO(\text{Triton X} - 100)}.$$

- Les dégranulations sont exprimées en fonction du contenu total β -hexosaminidase :

$$\text{dégranulation (\% du total)} = \frac{mDO - mDO(\text{tampon seul})}{mDO(\text{Triton X} - 100)}.$$

- Les dégranulations spécifiques sont également exprimées en fonction de la dégranulation de référence (obtenue par un anticorps anti-IgE humaines) :

$$\text{dégranulation (\% dégranulation de référence)} = \frac{mDO - mDO(\text{tampon seul})}{mDO(\text{anti - IgE}) - mDO(\text{tampon seul})}.$$

Afin d'exprimer numériquement les résultats obtenus pour chaque sérum et allergène testé, les courbes de dégranulation obtenues ont été modélisées en utilisant le logiciel GraphPad. L'équation de la courbe de régression et un exemple sont donnés figure 17.

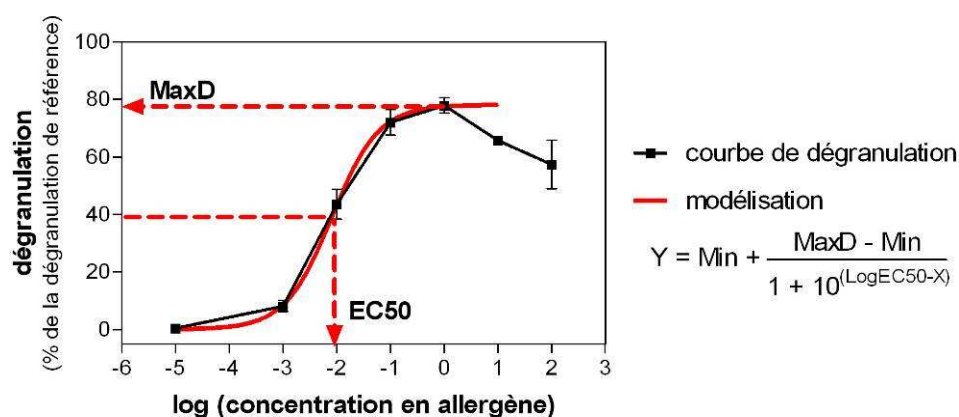


Figure 17 : Modélisation des résultats de dégranulation.

Cette modélisation permet de déterminer deux paramètres représentatifs des résultats obtenus : le maximum de dégranulation (MaxD) et l'EC50, correspondant à la dose d'allergène nécessaire pour induire 50% de ce maximum. Dans certains cas, les courbes ont été bimodales : le pourcentage de dégranulation atteint un premier plateau et pour des concentrations plus importantes d'allergènes, la dégranulation tend à augmenter à nouveau pour atteindre alors un second plateau. Dans ces cas-là, deux MaxD et EC50 ont été déterminés.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

La mise au point du test cellulaire a été réalisée en prenant pour modèle l'allergie à l'arachide. Elle s'appuie principalement sur l'utilisation d'un pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide représentatifs de la sérothèque, puis elle a été validée par l'analyse individualisée d'un nombre limité de patients allergiques à l'arachide. Le laboratoire bénéficie en effet d'une importante sérothèque de patients allergiques à l'arachide et notamment de sérums de patients fortement sensibilisés, c'est-à-dire présentant de fortes concentrations d'IgE spécifiques des protéines de l'arachide. Par la suite, le modèle cellulaire mis au point a été appliqué à l'étude du potentiel de dégranulation des protéines de l'arachide et du lait.

III.1. MISE AU POINT DU MODELE CELLULAIRE DE DEGRANULATION AVEC LES CELLULES RBL SX-38

La mise au point du modèle cellulaire de dégranulation inclut la caractérisation de la lignée cellulaire RBL SX-38 et l'optimisation des différents paramètres du test. A cette occasion, nous avons développé des tests de contrôle de l'expression du FcεRI humain par cytométrie en flux et immunoempreinte. Nous avons également sous-cloné la lignée cellulaire afin d'obtenir un clone stable ayant une forte expression du FcεRI et une importante capacité de dégranulation.

III.1.1. Choix du médiateur dosé pour évaluer la dégranulation des cellules

Le dosage de la β -hexosaminidase, une enzyme libérée lors de la dégranulation en même temps que l'histamine, est le marqueur couramment utilisé pour quantifier la dégranulation des cellules RBL 2H3 [363]. Cependant, l'histamine étant un médiateur très important de la réaction allergique, nous avons voulu comparer les libérations d'histamine et de β -hexosaminidase par les cellules RBL SX-38 activées via les IgE. Dans ce but, deux expériences ont été réalisées : l'une en faisant varier la quantité d'IgE pour sensibiliser les cellules et en activant ensuite la dégranulation avec une quantité fixe d'anticorps anti-IgE

humaines (figure 18, A) ; l'autre en sensibilisant les cellules avec une quantité fixe d'IgE puis en faisant varier la concentration d'anticorps anti-IgE pour activer les cellules (figure 18, B). La β -hexosaminidase et l'histamine libérées dans le surnageant ont ensuite été dosées en parallèle sur les mêmes surnageants de culture, et rapportées à la quantité totale de ces médiateurs libérée après lyse cellulaire au triton.

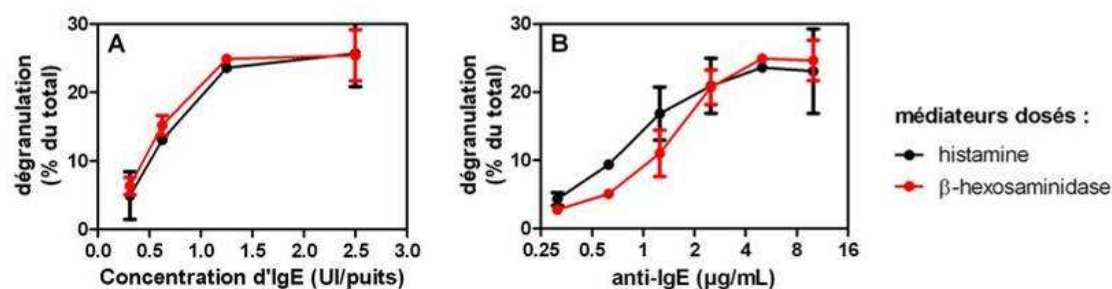


Figure 18 : Comparaison de la libération d'histamine et de β -hexosaminidase par les cellules RBL SX-38.

A : cellules sensibilisées par des doses croissantes d'IgE immunopurifiées du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide puis activées avec l'anticorps polyclonal anti-IgE humaines (clone STAR96) à 5 μ g/mL

B : cellules sensibilisées par 1,25 UI par puits d'IgE immunopurifiées du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide puis activées par une gamme de concentrations de l'anticorps polyclonal anti-IgE humaines (clone STAR96).

Après sensibilisation avec des doses croissantes d'IgE, les valeurs de libération d'histamine et de β -hexosaminidase sont très proches. Il en est de même après activation par une gamme de concentrations d'anticorps anti-IgE.

Les libérations d'histamine et de β -hexosaminidase par les cellules RBL SX-38 sont ainsi parallèles et non significativement différentes. Ces résultats confirment les observations de Lagunoff sur des mastocytes péritonéaux de rat [366]. Razin et coll. ont également montré avec des mastocytes de souris dérivés de la moelle osseuse que les libérations d'histamine, de LTC₄, de chondroïtine sulfate E et de β -hexosaminidase sont parallèles [367].

Le dosage d'histamine est un dosage enzymo-immunologique de type compétitif commercial et coûteux. Il est relativement lourd à mettre en œuvre car il requiert une étape de dérivatisation des échantillons, et les résultats sont obtenus en 24 h. Dans la littérature, la libération d'un autre médiateur, la sérotonine, permet également d'évaluer la dégranulation des cellules. Cependant, ce dosage requiert la manipulation de sérotonine tritiée [349;352]. Le dosage de la β -hexosaminidase repose quant à lui sur une réaction colorimétrique rapide (1 h).

De plus, il est peu coûteux, simple à mettre en œuvre et les réactifs ne sont pas toxiques. L'ensemble de ces avantages nous a conduit à adopter le dosage de la β -hexosaminidase par les cellules RBL SX-38 pour mesurer l'intensité de la dégranulation dans l'ensemble des expériences ultérieures.

III.1.2. Sous-clonage de la lignée et sélection du meilleur clone

En cultivant les cellules RBL SX-38, nous avons remarqué une hétérogénéité des populations cellulaires, notamment de par leur morphologie. Certaines cellules apparaissaient allongées et fortement adhérentes alors que d'autres étaient plus arrondies et avaient tendance à ne pas adhérer au support de culture. Nous avons donc tout d'abord réalisé un sous-clonage de la lignée cellulaire, puis les clones ont été cultivés dans un milieu de culture avec une pression de sélection plus ou moins importante (2,4 ou 1,2 mg/mL de généticine). Nous avons ainsi isolé puis amplifié 35 clones différents. Pour faire les expériences dans le but de sélectionner le meilleur clone, nous avons sélectionné 9 clones représentatifs des différentes morphologies observées (cellules allongées en faisceaux, arrondies en brique, crénelées) et avec des niveaux variables d'expression de la chaîne α à leur surface. Leur capacité à dégranuler (contenu total en β -hexosaminidase et intensité de dégranulation après liaison d'IgE et activation par un anticorps anti-IgE) a ensuite été analysée. Le tableau 8 synthétise les résultats obtenus pour ces 9 clones et la lignée-mère de cellules RBL SX-38.

Tableau 8 : Caractéristiques des clones de RBL SX-38

clone	morphologie des cellules	expression de la chaîne α du Fc ϵ RI humain				capacité de dégranulation	
		moyenne de fluorescence (FITC)		cellules positives (%)	RFI	contenu total en β -hexosa-minidase (mA à 405 nm)	dégranulation par un anticorps anti-IgE humaines de cellules sensibilisées avec le standard IgE humaines (% du total)
		contrôle isotypique	marquage chaîne α				
1	B	2,6	71	89	28	534	51
19	AF	4,8	94	96	20	1306	8
21	B	3,2	105	96	33	565	0
22	B/AF C	3,9	74	95	19	653	25
24	AF	4	100	98	25	565	53
25	AF	3,5	40	65	12	1587	48
26	B	2,3	63	56	28	1232	52
35	B C	4	132	98	33	618	28
38	AF	4,6	99	96	22	1649	54
lignée-mère	B/AF	3,2	146	94	46	733	30

B : en briques, AF : allongées en faisceaux, C : crénelées.

III.1.2.1. Expression de la chaîne α du Fc ϵ RI par les différents clones

L'analyse par cytométrie en flux des cellules RBL 2H3 marquées par l'anticorps anti-chaîne α humaine a mis en évidence des signaux équivalents à ceux observés pour le contrôle isotypique (non montré). Les résultats des marquages des différents clones de cellules RBL SX-38 par l'anticorps spécifique de la chaîne α du Fc ϵ RI humain sont exprimés en moyenne de fluorescence. Les résultats sont également exprimés en pourcentage de cellules positives (exprimant la chaîne α du Fc ϵ RI humain à leur surface), reflétant l'expression du récepteur en terme qualitatif, ou en RFI, reflétant l'intensité de cette expression (tableau 8). Ces paramètres sont significativement plus élevés après marquage des cellules RBL SX-38 avec l'anticorps anti-chaîne α du Fc ϵ RI humain que suite au marquage avec l'isotype contrôle. Les différents clones de cellules RBL SX-38 et la lignée-mère expriment donc bien la chaîne α du Fc ϵ RI humain, à des niveaux variables selon le clone considéré. Notons que les niveaux d'expression des différents clones restent inférieurs à celui de la lignée-mère.

Nous avons ensuite caractérisé ces différents clones selon leur capacité de dégranulation.

III.1.2.2. Evaluation de la capacité de dégranulation des différents clones

La quantité totale en β -hexosaminidase contenue dans les cellules est obtenue en lysant les cellules par du Triton X-100, l'absorbance obtenue est alors directement proportionnelle à cette quantité. Pour un même nombre de cellules ensemencées au départ du test de dégranulation, le contenu total en β -hexosaminidase présente une forte variabilité. Pour les 9 clones testés, les mesures s'échelonnent de 534 à 1649 mA, avec comme valeur de référence 733 mA obtenue pour la lignée-mère (tableau 8). Après sensibilisation des cellules par 1 UI d'IgE standard par puits et pontage par un anti-IgE, la capacité à libérer la β -hexosaminidase a été déterminée pour les différents clones (tableau 8). Certains clones (n°19 ou 21) montrent des pourcentages de dégranulation très faibles, voire nuls. A l'inverse, certains clones (n°1 ou 38) présentent les plus fortes capacités à dégranuler avec des valeurs presque 2 fois supérieures aux pourcentages estimés pour la lignée-mère.

Il est à noter que le seul niveau d'expression de la chaîne α ne permet pas de rendre compte de la capacité de dégranulation IgE-dépendante. Par exemple, le clone 21 présente des niveaux d'expression élevés de la chaîne α du récepteur, mais la dégranulation IgE-dépendante s'avère inefficace.

Afin d'approfondir la sélection du meilleur clone, des tests de dégranulation ont été effectués en sensibilisant les cellules avec cette fois-ci des IgE immunopurifiées à partir de sérums de patients allergiques à l'arachide. Les clones n°1 et n°38 ont été sélectionnés pour leurs meilleures capacités à dégranuler dans le test précédent et pour leurs différences de morphologie cellulaire, le clone n°1 étant constitué de cellules arrondies, en brique et le clone n°38 de cellules allongées en faisceaux. Les cellules de la lignée-mère et des clones n°1 et n°38 ont été sensibilisées à raison de 1 UI d'IgE/puits. Les IgE déposées ont été immunopurifiées à partir de sérums de patients allergiques à l'arachide (n°42, 263 et 392) caractérisés au laboratoire en termes d'IgE spécifiques, et activées avec un anticorps anti-IgE humaine (STAR96 à 3 μ g/mL) ou par un extrait brut d'arachide dilué à 35 ng/mL (figure 19).

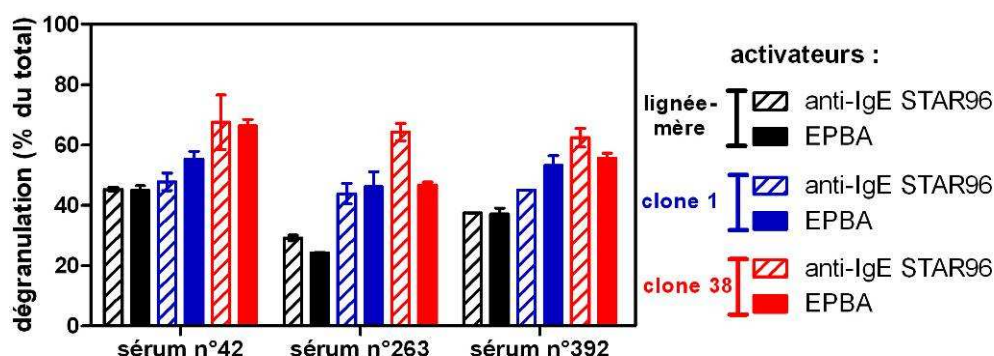


Figure 19 : Comparaison de la capacité de dégranulation des clones n°1 et n°38 et des cellules de la lignée-mère de RBL SX-38 sensibilisées par les IgE immunopurifiées des sérums n° 42, 263 et 392.

Pour chacun des 3 sérums utilisés, les pourcentages de dégranulation obtenus par l'anti-IgE ou avec l'EPBA sont plus importants pour les clones n°1 et 38 que pour la lignée-mère de cellules RBL SX-38. Le clone n°38 présente les plus fortes valeurs avec des pourcentages de dégranulation souvent supérieurs à 50%.

L'expression relativement importante de la chaîne α du Fc ϵ RI, un contenu très important en β -hexosaminidase, et une forte capacité à dégranuler, que ce soit après sensibilisation par un standard IgE humaine ou par des IgE immunopurifiées à partir de sérums de patients allergiques à l'arachide, nous a permis de sélectionner le clone n°38. Par ailleurs la lignée cellulaire résultante apparaît plus homogène, avec des cellules allongées et fortement adhérentes. Nous avons donc précisé la caractérisation de ce clone, notamment au niveau de l'expression de la chaîne β .

III.1.2.3. Caractérisation du clone sélectionné

Nous avons tout d'abord cherché à mesurer l'expression de la chaîne β humaine par cytométrie en flux. Les moyennes de fluorescence des cellules RBL SX-38 marquées par l'anticorps anti-chaîne β du Fc ϵ RI humain ont été de 6,6 +/- 0,3 vs 3,9 +/- 0,3 pour le contrôle isotypique (moyenne +/- erreur standard, n=4). Cette différence peu significative suggère soit que la chaîne β n'est pas exprimée, soit que l'anticorps n'est pas fonctionnel en cytométrie en flux (épitope non accessible). Nous avons donc vérifié dans un second temps l'expression de la chaîne β par une autre technique, la technique d'immunoempreinte.

Un lysat cellulaire en conditions dénaturantes a été réalisé à partir des cellules RBL SX-38 et RBL 2H3 (contrôle négatif), puis séparé par SDS-PAGE. Une immunoempreinte est ensuite réalisée avec le même anticorps anti-chaîne β du Fc ϵ RI humain. La figure 20 représente les électrophorèses et les immunoempreintes obtenues avec les extraits protéiques cellulaires RBL SX-38 et RBL 2H3.

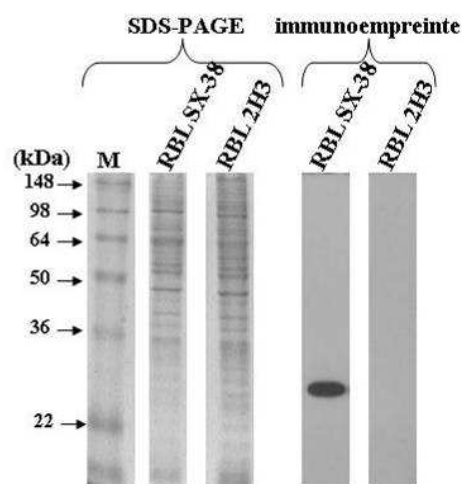


Figure 20 : Contrôle de l'expression de la chaîne β par immunoempreinte après séparation par SDS-PAGE des extraits protéiques cellulaires
(M : marqueur de masse moléculaire).

L'immunoempreinte obtenue avec le lysat cellulaire des cellules RBL SX-38 montre une bande située entre 22 et 36 kDa. Cette bande non présente pour le lysat des cellules RBL 2H3 correspond à la chaîne β du Fc ϵ RI humain de MM 28 kDa. Les cellules RBL SX-38 expriment donc bien la chaîne β du Fc ϵ RI. Bien que la localisation membranaire ne soit pas confirmée par cette technique, on peut supposer que la chaîne β est exprimée à la membrane. La conformation alors adoptée rendrait en effet inaccessible l'épitope reconnu par l'anticorps spécifique. L'extraction protéique et la séparation par électrophorèse dans des conditions dénaturantes permettraient le démasquage de l'épitope et sa reconnaissance par l'anticorps spécifique de la chaîne β .

Si les expressions des chaînes α et β humaines ont pu être caractérisées, l'expression de la chaîne γ n'a pas pu être vérifiée du fait d'absence d'anticorps commerciaux spécifiques de cette chaîne.

Les outils d'étude mis au point permettent un contrôle de l'expression de la chaîne α par le clone de cellules RBL SX-38 sélectionné (clone 38). Cette simple expression a été testée tout au long de ma thèse et a servi à contrôler l'absence de dérive de la lignée. Un premier contrôle est notamment effectué à chaque nouvelle décongélation du clone, et après une vingtaine de repiquages. L'expression de la chaîne α du Fc ϵ RI est restée constante au cours de la culture des cellules RBL SX-38.

La sélection clonale de cellules RBL SX-38 ainsi effectuée, les différents paramètres des quatre étapes (ensemencement, sensibilisation, activation, dosage d'un médiateur libéré) du test cellulaire de dégranulation ont été optimisées. Les résultats qui sont ici exposés reposent principalement sur l'utilisation des IgE immunopurifiées du pool de patients allergiques à l'arachide afin de sensibiliser les cellules. Ce pool a été caractérisé au laboratoire et contient 960 UI/mL d'IgE totales et 160 UI/mL d'IgE spécifiques de l'arachide. Les résultats ont ensuite été confirmés avec des sérums individuels de patients allergiques à l'arachide.

III.1.3. Adaptation du test cellulaire de dégranulation au format 96 puits

Les premiers travaux réalisés ont permis d'adapter ce test cellulaire au format 96 puits, facilitant l'étude simultanée de nombreux allergènes en minimisant les volumes de sérums nécessaires. Nous avons tout d'abord calibré le nombre de cellules à ensemercer par puits. Dans ce but, nous avons ensemencé 8000, 10000 ou 12000 cellules dans les puits d'une plaque 96 puits, puis comparé les dégranulations obtenues pour des cellules sensibilisées 24 h plus tard avec des IgE du pool de sérums de patients allergiques à l'arachide. L'activation est induite 24 h plus tard par ajout de Triton (contenu total en β -hexosaminidase), par un anticorps polyclonal spécifique des IgE (STAR96, dégranulation de référence) ou par l'EPBA. Les résultats sont représentés figure 21.

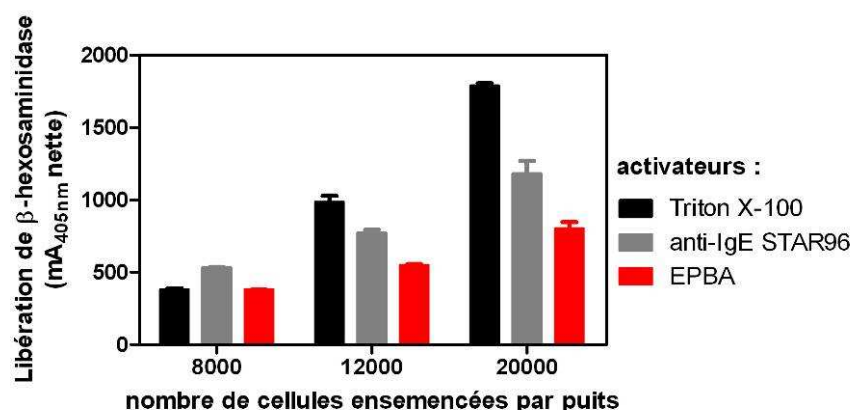


Figure 21 : Détermination du nombre de cellules optimales à ensemercer par puits pour le test de dégranulation.

Les résultats sont exprimés en mAU nette (après soustraction de la mAU basale obtenue avec des cellules sensibilisées mais non activées).

Deux jours après l'ensemencement de 8000 cellules par puits, les cellules ne sont pas encore pré-confluentes (formation d'un tapis cellulaire avec des interstices entre les cellules). Les libérations de β -hexosaminidase après activation sont également assez faibles. Un ensemencement de 20000 cellules par puits engendre la plus forte détection de β -hexosaminidase libérée après lyse cellulaire ou activation via les IgE. Par contre, l'analyse au microscope montre que les cellules ont poussé au-delà de la pré-confluence. Enfin, l'état des cellules qui sont pré-confluentes après 48 h et la quantité totale de β -hexosaminidase assez élevée nous a permis de définir le dépôt de 12000 cellules par puits comme optimal. Il est intéressant de noter que, quelque soit la quantité de cellulesensemencées au départ, la dégranulation spécifique obtenue avec l'EPBA exprimée en fonction de la dégranulation de référence s'est avérée identique (entre 68 et 71%).

III.1.4. Optimisation de l'étape de sensibilisation

III.1.4.1. Amélioration de la sensibilité et de la reproductibilité du test par prétraitement des sérums humains

L'utilisation des sérums de patients allergiques dilués à 10 UI/mL puis incubés pour la sensibilisation en milieu complet a engendré une mauvaise reproductibilité des expériences, des intensités de dégranulation assez faibles et des dégranulations basales assez élevées. Par exemple, pour le pool de sérums de patients allergiques à l'arachide utilisé directement pour

sensibiliser les cellules, nous avons réalisé un suivi des différentes dégranulations contrôles obtenues : la dégranulation basale et la dégranulation de référence IgE-dépendante (obtenue avec l'anti-IgE STAR96). En analysant 27 expériences réalisées sur différentes plaques et sur différents jours, nous avons constaté que les dégranulations basales (induites par le tampon seul) ont été assez élevées avec une grande variabilité : $5,8 \pm 4,8\%$ du total (moyenne $\pm$ écart-type). De plus, les dégranulations de référence obtenues avec l'anti-IgE STAR96 ont été à la fois faibles et très variables : $16 \pm 5,2\%$ du total (moyenne $\pm$ écart-type).

Nous avons donc cherché à améliorer la sensibilité et la reproductibilité du test cellulaire en comparant l'effet de plusieurs prétraitements des sérums sur la sensibilisation des cellules. Dibbern et coll. suggère qu'une pré-incubation des sérums sur des cellules RBL 2H3 (lignée non transfectée) pendant 2 h permet d'épuiser les sérums des facteurs responsables d'interactions non spécifiques avec les cellules et d'augmenter la sensibilité du test [352]. Palmer et coll. proposent un épuisement préalable des sera en IgG (par la protéine G) avant la sensibilisation des cellules [184]. Demeulemester et coll. ont également montré qu'un chauffage pendant 5 min à 56°C des sérums permettait d'augmenter la réactivité des IgE [368]. Enfin, il nous semblait intéressant de regarder l'effet de la décomplémentation des sérums (en les chauffant pendant 45 min à 56°C). Ce chauffage est réalisé en présence de glucose à une concentration finale de 2 M afin de protéger les IgE comme décrit par Binaghi et coll. [364].

Nous avons donc testé l'effet de ces différents prétraitements des sérums sur la dégranulation des cellules RBL SX-38 : pré-incubation des sérums sur les cellules RBL 2H3, chauffage de 5 min à 56°C ou de 45 min à 56°C en présence de glucose 2M, épuisement des sérums en IgG.

Lors d'expériences préliminaires, nous avons cherché à épuiser les IgG de 18 sérums de patients allergiques à l'arachide en les incubant avec la protéine G, protéine liant les IgG mais pas les IgE [365]. Cependant, après ce passage sur protéine G, les IgE résiduelles présentes dans la fraction non retenue ne présentaient que 3,4% des IgE totales. Une forte proportion des IgE pourraient en effet être complexées par des IgG anti-IgE, les retenant donc sur la protéine G via les IgG. Nous avons contourné ce problème en purifiant spécifiquement les IgE par chromatographie d'affinité sur un gel de sépharose greffé avec des anticorps monoclonaux anti-IgE humaines. Les IgE sont alors retenues sur le gel puis éluées par un choc acide avec un rendement de 60 à 70%. Par cette technique, les IgG anti-IgE complexées

aux IgE sont en théorie également éluées. Cependant, les autres composants des sérums, et notamment les IgG spécifiques d'allergènes, sont écartés.

Nous avons alors comparé la dégranulation de référence induite par l'anti-IgE STAR96 pour des cellules sensibilisées avec 4 sérums individuels de patients allergiques à l'arachide (n° 51, 92, 488 et 631) ayant subis les différents prétraitements. Les sérums ont été dilués afin d'incuber 1 UI d'IgE totales par puits pour sensibiliser les cellules RBL SX-38 pendant 24 h. Le tableau ci-dessous (tableau 9) présente les caractéristiques de ces sérums et les résultats des dégranulations obtenues avec l'anti-IgE.

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les sérums utilisés après différents prétraitements.

Sérums	IgE totales dans les sérums non traités (UI/mL)	Dégranulations de référence obtenues avec l'anti-IgE STAR96 (% du total)				
		non traités	pré-incubés sur cellules RBL 2H3	chauffés 5 min à 56°C	chauffés 45 min à 56°C	immuno-purifiés en IgE
51	2430	22	26	26	33	51
92	1170	28	23	30	42	65
488	470	21	16	17	39	46
631	630	22	21	19	41	49

Ces résultats montrent que la pré-incubation sur cellules RBL 2H3 et le chauffage modéré des sérums (5 min à 56°C) ne modifient pas ou peu l'intensité de la dégranulation de référence. A l'inverse, un chauffage plus long (45 min à 56°C) augmente de plus de 50% l'intensité de la dégranulation obtenue. L'immunopurification des IgE des sérums est le prétraitement qui entraîne les intensités de dégranulation les plus importantes. Les dégranulations sont en général près de 2 fois plus fortes qu'avec les sérums non traités.

L'effet des différents prétraitements des sérums a été également évalué lors de dégranulations spécifiques avec des gammes d'EPBA sur des cellules sensibilisées par le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. Le pool de sérums était prétraité selon les mêmes protocoles que précédemment. La figure 22 présente les courbes de dégranulation obtenues.

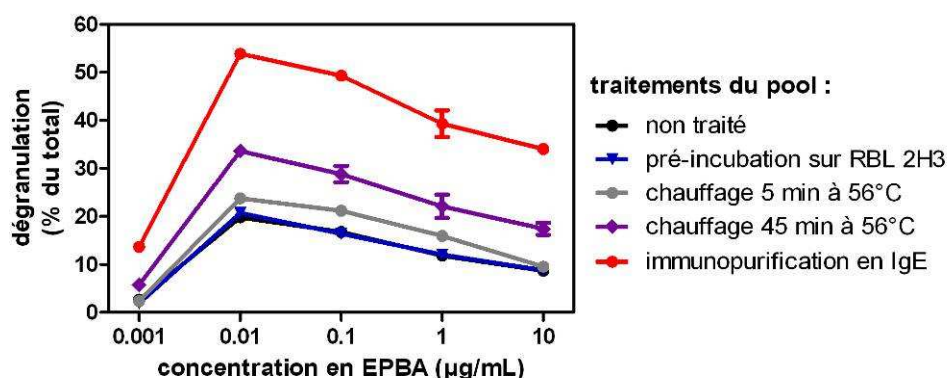


Figure 22 : Effets comparatifs des différents prétraitements du pool de sérums de patients allergiques à l'arachide sur la dégranulation induite par l'EPBA.

Les courbes de dégranulation obtenues après les différents prétraitements sont parallèles. Les dégranulations maximales sont obtenues dans tous les cas à 10 ng/mL d'EPBA. A cette concentration optimale d'activateur, la dégranulation spécifique pour le pool non traité est assez faible, n'atteignant que 20% de la dégranulation totale conformément aux résultats précédents. La pré-incubation sur cellules RBL-2H3 ne permet pas d'augmenter l'intensité de la dégranulation alors que le chauffage des sérums a un bénéfice significatif sur l'intensité de la dégranulation (24 et 34% de la dégranulation totale après 5 et 45 min respectivement). L'immunopurification en IgE des sérums est le prétraitement qui donne les meilleures dégranulations, atteignant 54% du contenu total en β -hexosaminidase.

Pour vérifier les effets de l'immunopurification en IgE du pool de 76 sérums sur l'intensité des dégranulations basales et la reproductibilité des expériences, nous avons également réalisé un suivi des différentes dégranulations contrôles obtenues : la dégranulation basale et la dégranulation de référence IgE-dépendante (obtenue avec l'anti-IgE STAR96) ont été mesurées après immunopurification sur 73 expériences menées sur différentes plaques et sur différents jours. Les dégranulations basales ont été de 3,2 $\pm$ 1,3% (moyenne $\pm$ écart-type) et les dégranulations de référence de 46 $\pm$ 10,7% (moyenne $\pm$ écart-type). Par conséquent, l'immunopurification des IgE des sérums permet de diminuer la dégranulation basale et d'augmenter par un facteur 3 la dégranulation de référence. La répétabilité et la reproductibilité sont alors correctes.

L'immunopurification des IgE est le prétraitement choisi pour nos futurs développements. Cette méthode choisie est, certes, la moins simple à mettre en œuvre mais procure de meilleures caractéristiques au modèle.

III.1.4.2. Optimisation de la quantité d'IgE

Afin d'optimiser la quantité de sérums utilisés pour sensibiliser les cellules dans les tests de dégranulation, nous avons effectué des dégranulations en sensibilisant les cellules avec des concentrations variables d'IgE issues de patients allergiques (n°51, 92, 470 et 631) ou du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. Elles ont été diluées dans une gamme de concentration de 2 en 2, allant de 30 à 1,9 UI/mL ou de 20 UI/mL à 1,25 UI/mL, pendant 24 h. La dégranulation est induite par l'anticorps monoclonal LE27 puis rapportée par rapport à la quantité de β -hexosaminidase libérée après lyse cellulaire au triton (% du total).

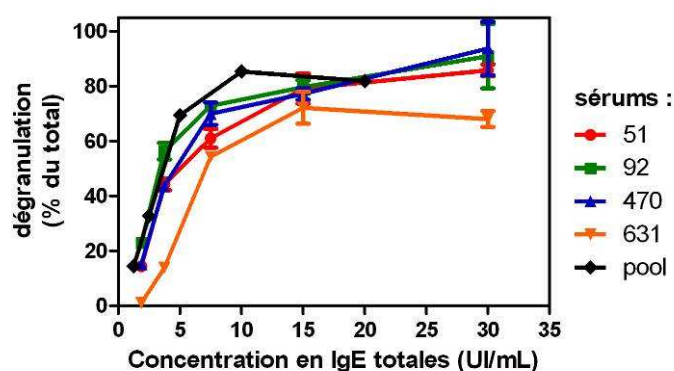


Figure 23 : Influence de la concentration en IgE immunopurifiées sur la dégranulation de référence des cellules RBL SX-38.

Pour tous les sérums testés, la dégranulation varie en fonction de la quantité d'IgE utilisée pour sensibiliser les cellules (figure 23). A partir d'une sensibilisation à 1 UI d'IgE par puits (10 UI/mL), la dégranulation atteint un plateau suggérant que cette quantité permet de sensibiliser tous les Fc ϵ RI présents sur les cellules dans nos conditions de culture. Si l'on considère que l'expression des Fc ϵ RI à la surface des cellules RBL SX-38 est de 130000/cellule [350], et que le nombre de cellules après 2 jours de culture est de 40000 par puits, 5,2 milliards de Fc ϵ RI sont présents par puits. Une Unité Internationale d'IgE correspond à 2,4 ng d'IgE, soit 7,7 milliards de molécules d'IgE. Dans ces conditions particulières de culture, l'ajout d'1 UI d'IgE équivaut à l'ajout de 1,5 molécules d'IgE pour une molécule de Fc ϵ RI exprimé à la surface d'une cellule. Ce rapport semble suffisant pour saturer les récepteurs et tous les sites de fixation des IgE seraient donc effectivement occupés.

III.1.4.3.Optimisation du volume de milieu dans lequel sont diluées les IgE

Les IgE étant diluées à 1 UI par puits pour une sensibilisation optimale, plusieurs volumes de milieu de dilution ont été testés. Il fallait déterminer le volume permettant une sensibilisation optimale des cellules tout en permettant de diluer au maximum les IgE dans le milieu de culture. En effet, une dilution d'au moins 1/5 est nécessaire pour l'apport en milieu de culture garantissant la pousse des cellules dans les plaques. Nous avons testé les volumes réactionnels de 50 μ L, 100 μ L et 200 μ L. Les dégranulations obtenues avec les IgE du pool immunopurifiées sont équivalentes quand la sensibilisation est effectuée dans un volume de 50 μ L ou 100 μ L. Par contre, dans un volume de 200 μ L, les dégranulations sont plus faibles. Les cellules étant adhérentes, la rencontre des IgE avec les cellules ne serait pas favorisée dans ce volume. Un volume de 100 μ L a été choisi afin de pouvoir diluer au maximum les sérums tout en garantissant l'accessibilité des IgE pour les cellules. Les IgE déposées dans les puits doivent donc être à une concentration de 10 UI/mL de fractions immunopurifiées.

III.1.4.4.Durée d'incubation des IgE avec les cellules

La durée de sensibilisation des cellules par les IgE a été également optimisée. Pour cela, une expérience a été conduite en modulant la durée d'incubation des IgE du pool immunopurifiées, diluées à 1 UI d'IgE par puits sur les cellules RBL SX-38, de 8 à 40 heures.

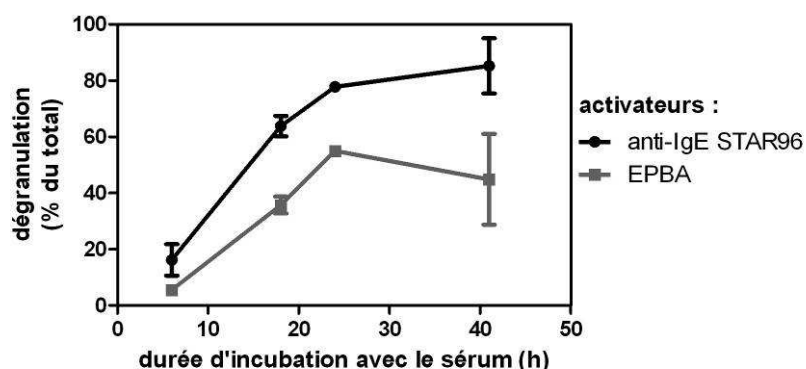


Figure 24 : Cinétique de l'étape de sensibilisation.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 24, la sensibilisation de cellules évolue en fonction du temps pour atteindre une valeur optimale après 24 h d'incubation des sérums. Une incubation prolongée de 40 h permet des dégranulations équivalentes à celles du temps

24 h pour l'anti-IgE et l'EPBA, mais elle génère des écarts-types très importants. Les sensibilisations seront donc réalisées sur 24 h par la suite.

III.1.5. Optimisation de l'étape d'activation

III.1.5.1. Durée d'incubation avec les activateurs

Le temps d'incubation des cellules sensibilisées avec les activateurs a également été optimisé. Les cellules RBL SX-38 ont été sensibilisées par 1 UI d'IgE immunopurifiées du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide puis l'anticorps polyclonal anti-IgE humaine STAR96 à 3 µg/mL ou l'EPBA à 35 ng/mL ont été incubés pendant 5, 15, 45 ou 60 min. La figure 25 montre les cinétiques de dégranulation ainsi obtenues.

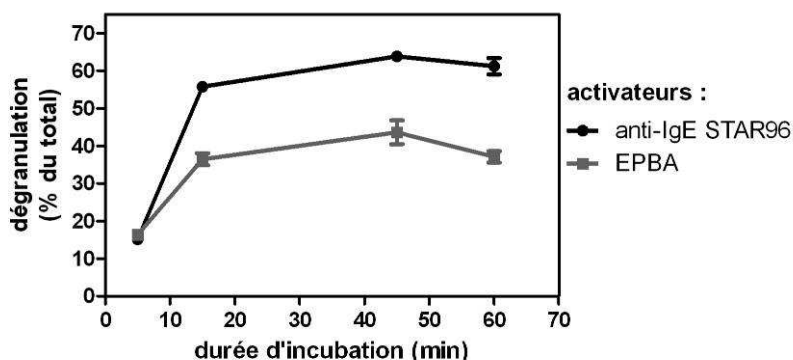


Figure 25 : Cinétique de la phase d'activation.

Quarante-cinq minutes d'activation sur les cellules sensibilisées permettent d'obtenir le maximum de dégranulation. Au-delà, à 60 min, les pourcentages de dégranulations ont tendance à diminuer suggérant une dégradation de la β -hexosaminidase libérée. Nous avons donc choisi de maintenir le temps d'incubation à 45 min.

III.1.5.2. Dégranulation de référence

La dégranulation IgE-dépendante est obtenue en pontant les IgE fixées sur les cellules avec un anticorps anti-IgE humaines. Elle peut être variable, dépendant notamment du contexte cellulaire et des sérums utilisés. Cette référence est réalisée systématiquement pour chaque sérum au cours de chaque expérience. Elle sert alors de référence pour exprimer les dégranulations spécifiques, et pour comparer les résultats d'une expérience à l'autre. La

détermination de cette valeur de référence dépend de l'anticorps anti-IgE utilisé pour la dégranulation. Plusieurs anticorps anti-IgE humaines, à différentes concentrations ont été testés pour des cellules sensibilisées avec les IgE du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. L'anticorps polyclonal de chèvre STAR96 et les anticorps monoclonaux de souris, clones LE27 (spécifique de la région Cε4) et BS17 (spécifique de la région Cε3) ont été testés.

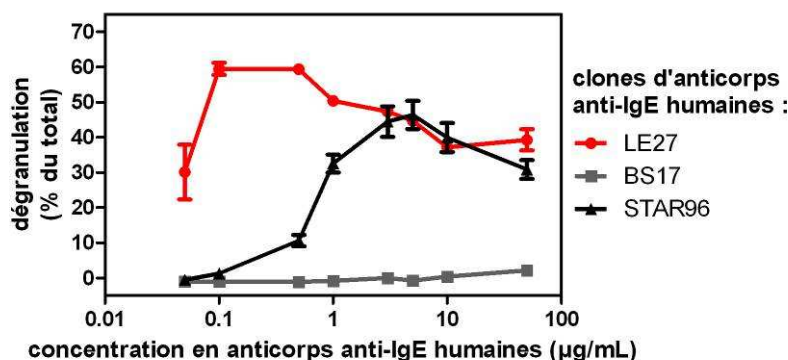


Figure 26 : Dégranulations par différents anticorps anti-IgE humaines de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec les IgE du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide.

L'anticorps polyclonal anti-IgE humaines STAR96 induit la dégranulation des cellules RBL SX-38 sensibilisées. L'intensité la plus élevée de cette dégranulation est atteinte pour une concentration de 3 μg/mL. A l'inverse, l'anticorps monoclonal BS17 n'induit pas la dégranulation des cellules RBL SX-38 sensibilisées. Cette absence d'effet est conforme aux données de la littérature. Cet anticorps a en effet été proposé pour être utilisé à des fins d'immunothérapie. Il provoque *in vitro* la dissociation d'IgE déjà combinées au FcεRI et empêche alors leur réassociation [369;370]. L'anticorps LE27 quant à lui, induit la dégranulation des cellules RBL-SX 38 sensibilisées à une concentration beaucoup plus faible que le STAR96. Une dose de 500 ng/mL permet en effet d'obtenir le maximum de dégranulation. De plus, l'intensité de la dégranulation maximale obtenue pour le LE27 est plus importante que pour le STAR96 (59 % contre 44 % du total, respectivement).

La dégranulation de référence, mettant en jeu à l'origine l'anticorps anti-IgE humaines STAR96, impliquera donc dorénavant l'anticorps anti-IgE humaines LE27.

III.1.6. Bilan des conditions expérimentales optimales pour le test cellulaire de dégranulation

Les différentes études précédentes nous ont permis de définir les conditions expérimentales optimales pour l'application du modèle cellulaire. Les conditions du test sont résumées dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Récapitulatif des conditions expérimentales pour réaliser le test de dégranulation cellulaire.

Étapes	Conditions expérimentales	durée
Ensemencement	• 12000 cellules RBL SX-38 par puits dans un volume de 100 μL de milieu • milieu de culture complet sans G418	24 h
Sensibilisation	• sérums préalablement immunopurifiés en IgE • quantité : 1 UI d'IgE par puits • volume : 100 μL/puits • milieu de culture sans SVF	24 h
Activation	• activateurs dilués dans 50 μL de tampon NaPIPES • contrôles : - dégranulation basale (pas d'activateur) - contenu total en β-hexosaminidase (lyse au Triton X-100 1%) - dégranulation de référence avec l'anti-IgE humaine (LE27 dilué à 500 ng/mL)	45 min
Dosage du médiateur	• dosage de la β-hexosaminidase libérée	1 h

Des dégranulations contrôles sont réalisées lors de chaque expérience sur chaque plaque de microtitration afin de s'assurer de la reproductibilité et de la fiabilité du test. Les dégranulations contrôles sont déterminées en sensibilisant les cellules avec les IgE immunopurifiées du pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide et en mesurant la dégranulation basale, le contenu total en β -hexosaminidase dans les cellules et la dégranulation de référence en activant les cellules avec l'anticorps anti-IgE humaines (clone LE27). L'analyse des valeurs obtenues pour ces différentes dégranulations tout au long de la mise au point du test cellulaire nous a permis de fixer des valeurs contrôles et leurs limites d'acceptabilité. En dehors de ces limites d'acceptabilité, les résultats de l'expérience ne sont pas pris en compte.

Les dégranulations basales obtenues ont été de 3,2 +/- 1,3% (moyenne +/- écart-type, n=73). Nous avons déterminé une valeur limite de la dégranulation basale : elle doit être inférieure à 8% du contenu total en β -hexosaminidase. Ce paramètre permet notamment de contrôler la viabilité cellulaire et le bon déroulement des lavages. En effet, des dégranulations basales importantes ont par exemple été constatées si le nombre de lavages était diminué. Les dégranulations basales, et surtout leurs variabilités, nous ont également permis de déterminer un seuil de positivité des dégranulations. Au cours des expériences, la dégranulation des cellules a été considérée comme significative si elle était supérieure à 5% du contenu total en β -hexosaminidase, après soustraction de la dégranulation basale. En-dessous de cette limite, la dégranulation est considérée comme nulle.

Le suivi des résultats du contenu total en β -hexosaminidase permet de mettre en évidence tout problème lors de la culture des cellules et de leur survie. Un contenu trop faible révèle un nombre de cellules insuffisant, notamment en cas de « toxicité » d'un sérum ou d'un défaut de milieu.

Le suivi de la dégranulation de référence permet de mesurer la capacité de dégranulation des cellules et de s'assurer de sa stabilité au cours du temps. Il permet aussi de s'assurer du bon déroulement de l'étape d'activation du test. Cette dégranulation a été de 69 +/- 7% du total (moyenne +/- écart-type, n=38). Nous avons déterminé une valeur seuil d'acceptabilité de 55%. Un témoin positif en-dessous de cette valeur suggère qu'il y a eu un problème au cours de l'expérience. Cette limite de dégranulation de référence a également été appliquée aux différents sérums immunopurifiés et permet notamment de contrôler la fonctionnalité des IgE après l'étape d'immunopurification. Pour 12 sérums individuels de patients allergiques à l'arachide, immunopurifiés en IgE, nous avons obtenu une dégranulation de référence qui est en moyenne de 69 +/- 10% du total (moyenne +/- écart-type) démontrant la bonne reproductibilité du test quelque soit l'origine sérique des IgE immunopurifiées.

III.1.7. Discussion sur la mise au point du modèle cellulaire de dégranulation

- **La sensibilisation : phase critique de la mise au point**

Le point critique de ce test de dégranulation est l'étape de sensibilisation des cellules. Nous avons trouvé qu'indépendamment du sérum utilisé, une quantité d'1 UI d'IgE par puits permet une sensibilisation optimale des cellules. Réduire ainsi la quantité d'IgE au maximum est crucial quand on utilise des sérums humains rares et précieux. Différentes équipes qui utilisent des tests de dégranulation similaires, sensibilisent les cellules en effectuant une dilution équivalente quelque soit le sérum. Dans leur test de dégranulation des basophiles, Koppelman et coll. diluent les sérums au 1/5 pour sensibiliser les basophiles [174]. Pour des tests utilisant d'autres lignées cellulaires, Lowe et coll. utilisent des sérums dilués au 1/10 [345] et Marchand et coll. au 1/50 [346]. Palmer et coll., qui utilisent un modèle cellulaire avec des cellules RBL SX-38 diluent les sérums du 1/5 au 1/20, selon leur teneur en IgE [184]. Seule l'équipe de Lehmann et coll. précise que les sérums sont utilisés dilués du 1/10 au 1/40, la dilution optimale étant déterminée pour chaque sérum après série de dilutions du 1/5 au 1/80 [371]. Dans nos expériences, l'optimisation de la quantité d'IgE nécessaire à la sensibilisation des cellules a permis de réduire au maximum la consommation de sérum, tout en garantissant une sensibilisation optimale.

Un autre point important de cette étape de sensibilisation est le mode de présentation des sérums. Lors de notre étude, les sérums utilisés directement sur les cellules donnaient des dégranulations basales importantes et des dégranulations de référence faibles et variables. L'observation d'une certaine toxicité des sérums est souvent rapportée dans ce type de test cellulaire, bien que les facteurs mis en cause n'aient pas encore été identifiés. Marchand et coll. et Vogel et coll. ont ainsi noté des dégranulations plus faibles pour certains sérums peu dilués et/ou des effets de cytotoxicité [346;348]. Dibbern et coll. ont observé des dégranulations basales importantes, allant de 10 à 25%, pour des cellules sensibilisées directement avec les sérums. Après une pré-incubation des sérums pendant 1 h sur les cellules RBL 2H3 (lignée non transfectée), cette dégranulation basale avait été réduite à 5 à 15% [352]. La pré-incubation sur les cellules RBL 2H3 permettrait d'éliminer les anticorps xénoréactifs (anticorps réagissant spécifiquement avec des antigènes d'une autre espèce).

Cependant, nous avons constaté que cette pré-incubation n'améliorait pas la dégranulation dans nos expériences, ce qui laisse supposer que les facteurs interférant dans notre test cellulaire ne sont pas xénoréactifs.

Nous avons testé d'autres prétraitements, notamment des chauffages à 56°C courts (5 min) et plus longs (45 min), en prenant soin d'ajouter dans ce dernier cas du glucose à une concentration finale de 2 M afin de protéger les IgE d'une dégradation/dénaturation [364]. Nous avons constaté qu'un court chauffage à 56°C des sérums augmentait légèrement la réactivité des IgE dans le test cellulaire. Le long chauffage (45 min à 56°C) correspond au traitement qui est réalisé pour décomplémenter des sérums dans les milieux de culture. La décomplémentation des sérums entraîne ici une augmentation significative de leur capacité à sensibiliser les cellules et à induire leur dégranulation.

Une déplétion en IgG des sérums a été démontrée comme améliorant également les dégranulations [184]. Cependant, après incubation des sérums avec la protéine G, la fraction non retenue contenait moins de 5% des IgE présentes initialement dans les sérums. La majorité des IgE de ces sérums est complexée par des IgG anti-IgE, épuisant donc de façon « non spécifique » les IgE. La technique de purification des IgE par chromatographie d'affinité sur sépharose couplée à des anticorps monoclonaux anti-IgE humaines, qui avait été préalablement développée au laboratoire pour d'autres applications, a permis de purifier spécifiquement les IgE des sérums. Les IgG anti-IgE sont également retenus sur la sépharose *via* les IgE auxquelles ils sont complexés et sont finalement présents dans la fraction immunopurifiée en IgE. L'immunopurification en IgE des sérums est le prétraitement qui permet de diminuer au maximum la dégranulation basale, et qui donne les meilleures dégranulations, atteignant 54% du contenu total en β -hexosaminidase. Les résultats ainsi obtenus sont meilleurs que ceux observés après la décomplémentation des sérums. L'effet du complément seul ne permet donc pas d'expliquer toutes les interférences observées. Il semble donc que ces interférences résultent d'un effet conjoint du complément (qui est plus ou moins important selon les sérums) et de l'encombrement stérique dû aux IgG présentes en très grand nombre dans les sérums. L'utilisation des sérums immunopurifiés en IgE nous a permis de nous affranchir de ces différents facteurs d'interférence et d'augmenter la sensibilité du test cellulaire.

- **Des intensités de dégranulation fortes**

Dans les conditions expérimentales optimisées du test cellulaire, l'eau deutérée (D_2O) n'est pas utilisée pendant la phase d'activation. Il a été rapporté que la présence de D_2O dans le tampon de dégranulation augmente la sécrétion de β -hexosaminidase par les cellules RBL 2H3 [372]. La plupart des autres tests cellulaires utilisant des lignées cellulaires de mastocytes de rat humanisées incorpore du D_2O dans le milieu pendant cette phase [345;346;348;373]. Nous avons cependant choisi de ne pas utiliser de D_2O pour des raisons pratiques et parce que le modèle que nous avons optimisé donne des intensités de dégranulations déjà satisfaisantes.

Les cellules RBL SX-38 utilisées dans ce test cellulaire expriment fortement les 3 chaînes du Fc ϵ RI humain (α , β et γ). Wantke et coll. ont en effet évalué cette expression à 130000 récepteurs par cellule [350]. Cette expression forte et complète du récepteur explique les intensités de dégranulation plus importantes dans notre test que celles observées avec des cellules exprimant uniquement la chaîne α du Fc ϵ RI humain dans une faible proportion (25000 par cellule [344]). A titre d'exemple, les dégranulations obtenues avec un anticorps anti-IgE humaine sont inférieures à 40% du contenu total en β -hexosaminidase [344], voire à 25% dans la plupart des études [346;347] alors que dans notre modèle, les dégranulations de référence sont de l'ordre de 70% du total. Ces résultats sont comparables à ceux d'une étude récente de Ladics et coll. (2008) qui compare les capacités de dégranulation des cellules RBL SX-38, exprimant la totalité du Fc ϵ RI et de deux lignées cellulaires n'exprimant que la chaîne α du Fc ϵ RI. Ils ont montré que les cellules RBL SX-38 induisaient des dégranulations d'une intensité beaucoup plus forte pour un même sérum [374].

Par ailleurs, l'optimisation des différentes étapes a conduit à l'obtention d'un modèle beaucoup plus sensible que des modèles cellulaires utilisant la même lignée cellulaire ou des tests classiques de dégranulation de basophiles. Dibbern et coll. et Palmer et coll., qui ont utilisé la même lignée cellulaire, obtiennent des dégranulations de référence de 43% et 36% en moyenne (n=18 et 12 respectivement) [184;352]. Koppelman et coll., dans un test de dégranulation de basophiles, a obtenu une moyenne de 17% de la dégranulation totale après activation par un anti-IgE (n=10) [174]. Parmi les paramètres optimisés qui influent sur l'intensité de ces dégranulations, on peut citer l'anticorps anti-IgE humaine utilisé et l'immunopurification en IgE des sérums. En effet, nous avons vu que l'anticorps STAR96 induisait des dégranulations moins fortes que l'anticorps monoclonal LE27 et l'immunopurification des IgE a également permis d'augmenter fortement l'intensité de la dégranulation de référence.

Un test cellulaire de dégranulation utilisant des lignées immortalisées de cellules effectrices humanisées adapté au format 96 puits permet une application aisée pour l'étude simultanée d'un grand nombre de protéines. Par ailleurs, notre test cellulaire s'avère être très sensible, présentant des intensités de dégranulation plus élevées que pour les autres modèles cellulaires de dégranulation et des dégranulations basales relativement faibles.

III.2. APPLICATIONS DU MODELE CELLULAIRE

Ce modèle cellulaire a pu être valorisé dans de nombreuses applications pour l'étude des allergènes du lait et de l'arachide. Il permet ainsi de confirmer la fonctionnalité d'allergènes issus d'aliments complexes, devenant dès lors un outil complémentaire aux études simples de liaison des protéines purifiées avec les IgE de patients allergiques (EAST et inhibition d'EAST). Il permet également d'obtenir de plus amples informations sur les allergènes purifiés, notamment par leur capacité à induire le déclenchement de la réaction allergique, et d'évaluer l'effet de changements structuraux sur ce potentiel.

III.2.1. Etude des allergènes du lait

III.2.1.1. Confirmation de la fonctionnalité des allergènes purifiés

En premier lieu, le test cellulaire permet de confirmer la fonctionnalité d'allergènes purifiés d'aliments, c'est-à-dire leur capacité à ponter des IgE spécifiques et à induire la dégranulation des cellules RBL SX-38.

Dans le cadre du programme européen EuroPrevall, une banque d'allergènes purifiés a été constituée. Cette banque d'allergènes doit permettre le développement de nouveaux outils d'analyse permettant un diagnostic plus sûr et plus rapide des allergies alimentaires IgE dépendantes. Ces outils comprennent de nouveaux formats de tests de liaison aux IgE tels que « les puces à protéines » ainsi que des tests cellulaires. Dans ce cadre, le laboratoire a purifié différents allergènes du lait de vache et de chèvre (α -lac, β LG et caséines de vache, caséines de chèvre). Après confirmation de leur pureté et immunoréactivité par dosage ELISA et par tests de liaisons aux IgE de patients allergiques au lait, la fonctionnalité de ces protéines a été

confirmée à l'aide de notre test de dégranulation mastocytaire. Dans cette optique, des sérums de patients allergiques au lait provenant du Dr E. Paty ont été caractérisés.

Cette première application du modèle ayant été réalisée avant que sa mise au point ne soit finalisée, les sérums ont été utilisés sans traitement préalable pour la sensibilisation des cellules RBL SX-38 (c'est-à-dire sans immunopurification des IgE). Les IgE totales et spécifiques des différentes protéines purifiées du lait de vache et de chèvre ont été quantifiées en EAST afin de sélectionner les sérums d'intérêt pour notre étude, c'est-à-dire des sérums ayant des concentrations d'IgE spécifiques suffisantes. Des sérums de patients allergiques à l'arachide et non sensibilisés au lait ont été inclus en tant que témoins négatifs. Les résultats de ces dosages sont présentés tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques sérologiques des sérums.

Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques (UI/mL)			
		anti- β LG bovine	anti- α -lac bovine	anti-caséines bovines	anti-caséines caprines
BCB28	510	5	3	33	130
BCB29	1770	5	6	6	17
BCB69	1550	9	31	180	200
BCB77	480	3	-	15	26
BCB83	2000	12	6	85	nd
263	2600	-	-	-	-
470	7520	-	-	-	-

Les sérums BCB28, BCB29, BCB69, BCB77 et BCB83 proviennent de patients allergiques aux laits de vache et de chèvre. Les sérums n°263 et 470 proviennent de patients allergiques à l'arachide. (- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL), nd : non déterminé).

Les sérums de patients allergiques à l'arachide (n° 263 et 470) ne démontrent pas la présence d'IgE spécifiques des protéines de lait. A l'inverse, les sérums de patients allergiques au lait de vache ont des IgE spécifiques dirigées contre au moins trois des quatre protéines ou fractions protéiques (caséines entières) du lait testées. Quatre patients sur les 5 possèdent des IgE contre toutes les protéines testées. On peut noter néanmoins une concentration en IgE spécifiques des caséines bovines et caprines plus importantes que les concentrations en IgE spécifiques de la β LG ou de l' α -lac. Les concentrations en IgE sont parfois près de 10 à 20 fois supérieures contre les caséines entières que contre les protéines du lactosérum (BCB28 et BCB83). La réponse IgE aux caséines bovines et caprines montre des concentrations semblables avec toutefois une réponse supérieure pour la caséine caprine. Pour réaliser l'étude de la fonctionnalité des allergènes, nous avons choisi d'utiliser les sérums n°

263 et 470 (sérums de patients allergiques à l'arachide) afin de réaliser les témoins de spécificité de dégranulation et les sérums n° BCB28, BCB69 et BCB83 afin de vérifier la fonctionnalité de ces allergènes purifiés du lait de vache et de chèvre.

Aucune dégranulation spécifique n'a été observée avec les sérums de patients allergiques à l'arachide (non montré). La figure 27 représente les dégranulations obtenues avec les cellules sensibilisées par le sérum BCB69, puis activées avec les gammes de concentrations des différentes protéines du lait.

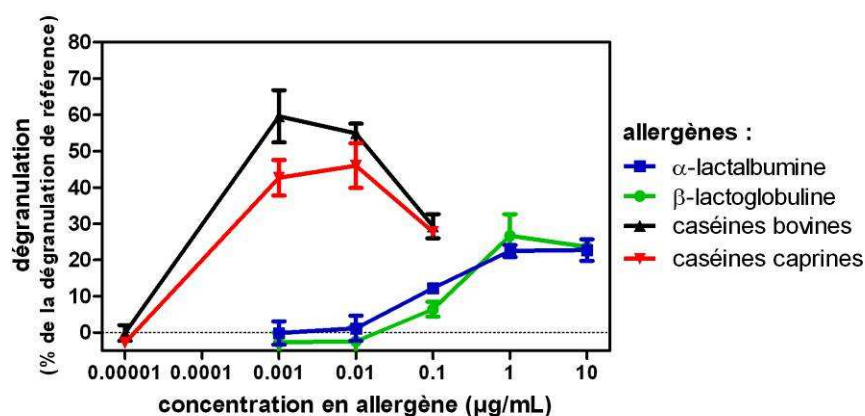


Figure 27 : Libération de β -hexosaminidase de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec le sérum BCB69 et activées par les allergènes purifiés du lait : α -lactalbumine, β -lactoglobuline et caséines bovines et caprines.

Les quatre protéines induisent une dégranulation significative des cellules. Cependant, des différences sont observées entre les protéines. Pour la β LG et l' α -lac, la dégranulation est maximale pour une dose de 1 μ g/mL, et atteint respectivement 27 et 24 % de la dégranulation de référence (induite par l'anti-IgE LE27). Pour les caséines de vache et de chèvre, la dégranulation est maximale pour des doses plus faibles (1 et 10 ng/mL respectivement) et les pourcentages de dégranulation obtenus sont plus élevés (64 et 52 % de la dégranulation de référence respectivement). Afin de comparer les résultats obtenus pour les 3 sérums de patients allergiques au lait testés, les courbes de dégranulation ont été modélisées et les maxima de dégranulation (MaxD) et EC50, c'est-à-dire la concentration pour obtenir 50% du MaxD, ont été calculés. Les résultats sont rapportés tableau 12.

Tableau 12 : Dégranulation basale, dégranulation nette de référence obtenues selon les sérums, maximum de dégranulation (MaxD) et EC50 calculés pour les différents sérums et les différents allergènes purifiés du lait de vache et de chèvre.

Sérums	dégranulation basale (% du total)	dégranulation nette de référence (% du total)	dégranulations spécifiques							
			β LG		α -lac		caséines bovines		caséines caprines	
			MaxD (% réf)	EC50 (ng/mL)	MaxD (% réf)	EC50 (ng/mL)	MaxD (% réf)	EC50 (ng/mL)	MaxD (% réf)	EC50 (ng/mL)
BcB28	7	27	0	/	0	/	36	1,1	68	0,7
BcB69	7	28	27	160	24	90	64	0,3	52	0,4
BcB83	5	48	13	590	18	2700	34	0,3	9	2,5
263	5	52	0	/	0	/	0	/	0	/
470	4	65	0	/	0	/	0	/	0	/

Les dégranulations basales (cellules sensibilisées par les sérums et activées par le tampon d'activation seul) se sont révélées être assez élevées. De plus, les dégranulations nettes de référence ne sont pas homogènes, ce qui laisse supposer que des facteurs interférants sont présents dans les sérums, gênant la liaison des IgE à leur récepteur et/ou l'activation des cellules. Cependant, les dégranulations spécifiques étant exprimées par rapport à cette dégranulation de référence, les différences d'intensités de dégranulation obtenues sont nivelées. Ces résultats sont conformes à ceux que nous observons lors de l'utilisation de sérums non traités.

Les MaxD obtenus avec les caséines bovines et caprines sont plus élevées que les MaxD obtenues avec la β LG et l' α -lac bovines. Les dégranulations induites par l' α -lac et la β LG ne sont d'ailleurs même pas significatives pour le sérum BCB28. Les MaxD semblent être corrélés aux taux d'IgE spécifiques vs IgE totales dans les sérums pour le sérum BCB69. Pour le sérum n° BCB83, cette relation n'est pas vérifiée. En effet pour ce dernier sérum, malgré les pourcentages d'IgE spécifiques vs totales de la β LG et de l' α -lac inférieurs à 1%, les MaxD atteignent respectivement 13 et 18% de la dégranulation de référence.

La comparaison des EC50 confirme ces différences, bien que les faibles intensités de dégranulation observées avec les sérums non purifiés rendent parfois difficiles les estimations et les comparaisons des EC50. Néanmoins, les EC50 obtenues pour la β LG et l' α -lac bovines (entre 90 et 2700 ng/mL) se sont avérées beaucoup plus élevées que pour les caséines bovines

et caprines (entre 0,3 et 2,5 ng/mL). Les caséines semblent donc avoir un plus fort potentiel de dégranulation dans ce test cellulaire et avec les sérums testés.

Cette première étude a donc permis de confirmer la fonctionnalité des protéines et fractions protéiques purifiées du lait de vache et de chèvre, ces protéines étant effectivement capables d'induire *in vitro* des dégranulations spécifiques. Ces résultats ont été inclus dans une publication décrivant la méthode de purification et de caractérisation des allergènes du lait de vache et de chèvre [353] (Annexe I). Cependant, l'analyse des résultats de dégranulations pour les 3 sérums de patients allergiques au lait a généré des interrogations sur le lien entre le pourcentage des IgE spécifiques vs IgE totales et la dégranulation, ainsi que sur le potentiel de dégranulation de ces différents allergènes du lait de vache et de chèvre.

III.2.1.2.Comparaison du potentiel de dégranulation des allergènes purifiés des laits de vache et de chèvre

Des tests cellulaires de dégranulation ont été réalisés en sensibilisant les cellules avec, cette fois, des IgE immunopurifiées provenant d'une population de patients allergiques au lait plus importante. De plus, les allergènes purifiés du lait de vache et de chèvre testés ont été plus nombreux, incluant la fraction lactosérum, la fraction caséine entière et certains de leurs constituants, respectivement la β LG et les caséines α s1, α s2, β et κ .

III.2.1.2.a.Caractéristiques des sérums utilisés

Pour sélectionner les sérums de patients allergiques au lait de vache et de chèvre à intégrer à l'étude, nous nous sommes basés sur les résultats des dosages en IgE totales et spécifiques réalisés au laboratoire. Nous avons également restreint la sélection aux sérums pour lesquels les volumes n'étaient pas limitants. Seuls les sérums présentant les plus fortes réponses IgE spécifiques ont été sélectionnés, et ne sont donc pas représentatifs de la population des patients allergiques au lait. Au final, 5 sérums de la sérothèque de patients allergiques au lait ont répondu à nos critères. Deux sérums avaient été prélevés à des patients allergiques au lait de chèvre mais tolérant le lait de vache (BCB 26 et BCB 96). Les deux autres provenaient de patients allergiques aux deux laits. Les résultats des dosages des IgE

totales et spécifiques des allergènes du lait de vache et de chèvre contenues dans ces sérums sont rapportés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Dosage des IgE totales et spécifiques des allergènes du lait de vache et de chèvre dans les sérums de patients allergiques au lait de vache et de chèvre, dans les sérums de patients allergiques au lait de chèvre tolérant le lait de vache (BCB26, BCB96) et dans le pool des sérums de patients allergiques à l'arachide (432/831, témoin négatif)

Sérums	Allergie	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques des allergènes du lait de vache (UI/mL et % IgE totales)							IgE spécifiques des allergènes du lait de chèvre (UI/mL et % IgE totales)						
			LS	βLG	cas	cas αs1	cas αs2	cas β	cas κ	LS	βLG	cas	cas αs1	cas αs2	cas β	cas κ
BCB26	lait de chèvre	550	-	0,4 0,1	0,2 0,04	1,1 0,2	0,8 0,1	0,5 0,1	-	2 0,4	0,9 0,2	30 5,5	29 5,3	12 2,2	8 1,5	5 0,9
BCB96		630	0,1 0,02	3,5 0,6	0,5 0,1	0,7 0,1	0,3 0,05	5,2 0,8	-	-	6,5 1,0	50 7,9	45 7,1	17 2,7	18 2,9	9 1,4
BCB83	lait de vache et de chèvre	2000	115 5,8	12 0,6	85 4,2	80 4,0	135 6,8	10 0,5	8 0,4	95 4,8	8,5 0,4	73 3,7	>300 >15	9,5 0,5	8 0,4	5 0,3
BCB100		950	210 22,1	53 5,6	95 10	70 7,4	90 9,5	61 6,4	13 1,4	8 0,8	4 0,4	79 8,3	205 21,6	25 2,6	35 3,7	15 1,6
BCB116		490	30 6,1	11 2,2	21 4,3	37 7,6	20 4,1	18 3,7	0,7 0,1	32 6,5	12 2,4	65 13,3	75 15,3	33 6,7	38 7,8	15 3,1
432/831	arachide	405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LS : lactosérum, βLG : bêta-lactoglobuline, cas : caséine

- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL).

Les sérums testés présentent tous des concentrations en IgE totales supérieures à 400 UI/mL. Aucune IgE spécifique des allergènes du lait de vache et de chèvre n'a été détectée dans le pool des deux sérums de patients allergiques à l'arachide (432/831). A l'inverse, les sérums de patients allergiques au lait présentent une réponse IgE à chacune des protéines testées. Les seules exceptions correspondent aux sérums BCB26 et BCB96 qui n'ont pas d'IgE dirigées contre la caséine κ et la fraction lactosérum bovines. Pour le sérum BCB26, les concentrations en IgE spécifiques des allergènes du lait de vache sont tous inférieures à 1,1 UI/mL. En comparaison, la réponse IgE aux protéines caprines, et particulièrement aux caséines, est particulièrement forte, parfois équivalente à 30 UI/mL. Le sérum BCB96 a cette même disproportion de réponses IgE entre protéines bovines et caprines. Dans ce cas, la réponse IgE à la protéine caprine peut être jusqu'à 100 fois plus forte que celle obtenue avec son équivalent bovin. Elle peut atteindre des valeurs supérieures à 30 UI/mL (concentrations mesurées pour les IgE anti-caséine entière ou anti-caséine αs1 de chèvre). En fait, ces deux

sérums correspondent à des patients ayant une allergie particulière dans la mesure où ils sont allergiques au lait de chèvre mais tolèrent le lait de vache. Cette particularité est à distinguer de l'allergie au lait de vache chez des patients réagissant aux produits laitiers de chèvre et de brebis. Ce phénomène se traduit ainsi par une réponse IgE spécifiquement dirigée contre les protéines caprines.

Par contre, les 3 sérums provenant de patients présentant à la fois une allergie aux laits de vache et de chèvre contiennent des IgE spécifiques des allergènes du lait de vache et de chèvre spécifiques de la fraction lactosérum et de la β LG et des différentes caséines. Une très grande variabilité de la réponse IgE aux protéines de lait est observée parmi ces 3 sérums. Pour le sérum BCB100, les concentrations en IgE sont plus importantes contre les allergènes du lait de vache que du lait de chèvre (sauf par la caséine α s1) tandis que le phénomène est inversé pour le sérum BCB116. Pour les caséines, 2 de ces sérums montrent des concentrations en IgE spécifiques des caséines α s2 bovines plus fortes que celles dirigées contre les autres caséines. Pour les allergènes du lait de chèvre, la caséine α s1 est l'allergène purifié le plus reconnu par les IgE.

III.2.1.2.b. Profil des courbes de dégranulation induites par les différents allergènes des laits de vache et de chèvre

Les 5 sérums de patients allergiques aux laits de vache et/ou de chèvre ont été immunopurifiés en IgE, puis les cellules RBL SX-38 ont été sensibilisées par cette fraction. Les dégranulations ont été induites par des gammes des différents allergènes purifiés des laits de vache et de chèvre. Des cellules sensibilisées par des IgE d'un pool de 2 sérums de patients allergiques à l'arachide non sensibilisés aux allergènes des laits de vache et de chèvre (432/831) et activées par les mêmes gammes de concentrations en allergènes ont été utilisées comme de témoin de spécificité. Aucune dégranulation significative n'a été obtenue pour les concentrations en allergènes considérées.

A titre d'exemple, les dégranulations obtenues par des cellules sensibilisées par le sérum BCB116 et induites par les allergènes des laits de vache et de chèvre sont représentées figure 28. Afin de comparer le potentiel de dégranulation des différents allergènes, les concentrations en allergènes sont exprimées en concentration molaire. Pour ce sérum, des dégranulations spécifiques sont constatées pour tous les allergènes testés. Les caséines α s2 bovine et caprine sont, pour ce sérum, les allergènes les plus fonctionnels dans la mesure où

elles provoquent des dégranulations à de faibles doses par rapport aux autres allergènes purifiés. Le profil de dégranulation montré pour les allergènes de chèvre diffère de celui obtenu pour les allergènes de vache.

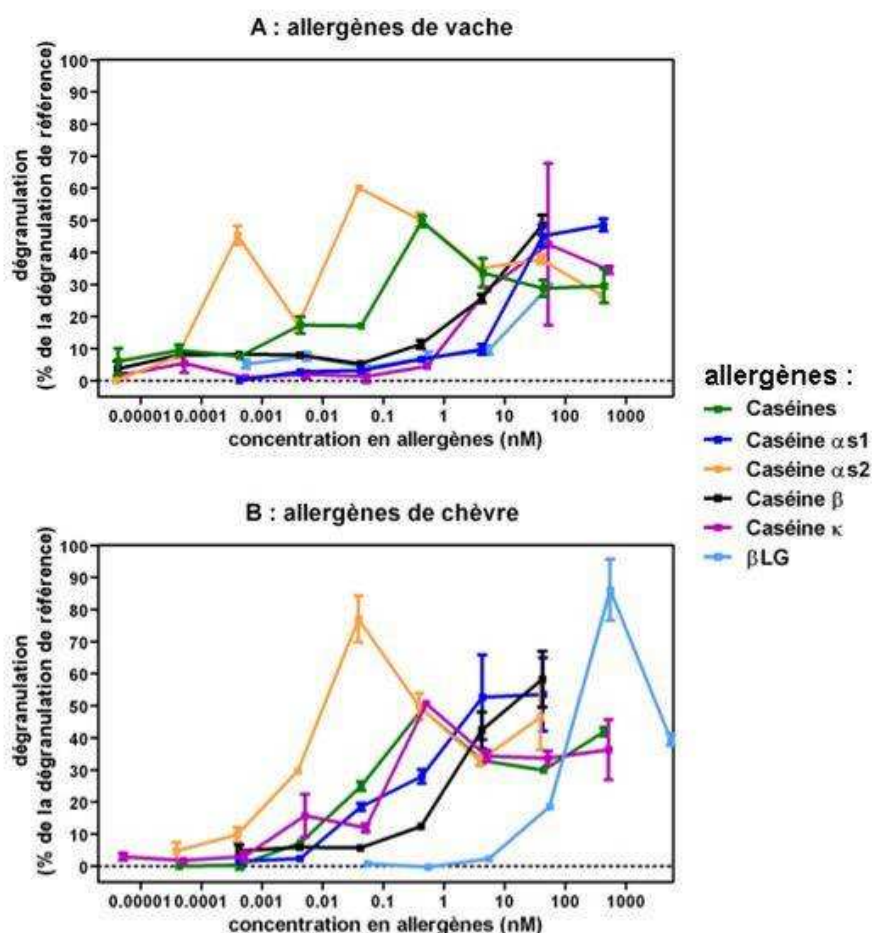


Figure 28 : Dégranulations des cellules RBL SX-38 sensibilisées par des IgE immunopurifiées du sérum BCB116 puis activées par les allergènes du lait de vache (A) et du lait de chèvre (B).

Pour les 5 sérums testés, les courbes de dégranulation obtenues ont été modélisées afin de déterminer les MaxD et les EC50 pour chaque allergène. Ces résultats sont reportés dans le tableau 14 pour les allergènes du lait de vache et dans le tableau 15 pour les allergènes du lait de chèvre.

Tableau 14 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par les différents allergènes du lait de vache.

Sérums	allergènes du lait de vache											
	βLG		Cas		cas αs1		cas αs2		cas β		cas κ	
	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)
BCB26	nd		0	/	nd		nd		nd		nd	
BCB96	71	3,1.10 ⁵	21	4,3.10 ¹	0	/	21	1,1.10 ⁶	65	3,9.10 ⁴	0	/
BCB83	6	3,2.10 ⁴	19	2,0.10 ⁻²	14	2,0.10 ⁻¹	16	5,0.10 ²	15	1,6.10 ⁴	15	1,5.10 ³
BCB100	29	3,6.10 ²	27	7,0.10 ⁻³	37	3,5.10 ³	70	6,8.10 ³	22	8,0.10 ⁻³	37	6,0.10 ⁴
BCB116	32	1,6.10 ⁴	52	9,8.10 ¹	53	1,3.10 ⁵	60	2,5.10 ⁻¹	66	5,0.10 ³	40	2,6.10 ³

Les MaxD sont exprimés en pourcentage de la dégranulation de référence obtenue avec l'anticorps anti-IgE humaines. Les EC50 sont exprimées en pM.

Tableau 15 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par les différents allergènes du lait de chèvre.

Sérums	allergènes du lait de chèvre											
	βLG		Cas		cas αs1		cas αs2		cas β		cas κ	
	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)
BCB26	62	1,2.10 ⁶	51	7,0.10 ¹	53	7,0.10 ⁻¹	62	7,2.10 ⁰	75	2,1.10 ⁴	61	9,3.10 ³
BCB96	73	6,4.10 ⁵	52	1,4.10 ²	59	3,5.10 ⁰	62	1,7.10 ⁰	68	6,3.10 ⁰	39	8,1.10 ²
BCB83	42	5,8.10 ⁶	19	4,3.10 ⁵	13	4,7.10 ²	17	3,9.10 ⁴	8	1,4.10 ⁵	21	1,8.10 ³
BCB100	37	1,6.10 ⁵	26	3,7.10 ²	32	6,3.10 ⁰	0	/	24	4,4.10 ⁰	40	1,6.10 ³
BCB116	91	1,2.10 ⁶	51	4,2.10 ²	55	3,7.10 ³	80	6,2.10 ⁰	60	2,1.10 ⁴	55	1,4.10 ³

Les MaxD sont exprimés en pourcentage de la dégranulation de référence obtenue avec l'anticorps anti-IgE humaines. Les EC50 sont exprimées en pM.

Pour le sérum BCB26 provenant d'un patient ayant une allergie au lait de chèvre sans allergie au lait de vache, les dégranulations induites par les fractions lactosérum et caséine entière de vache n'ont pas été significatives. Les dégranulations engendrées par les différents allergènes purifiés de ces fractions n'ont donc pas été réalisées. Pour le sérum BCB96 provenant également d'un patient allergique au lait de chèvre sans allergie au lait de vache, les dégranulations induites par le lactosérum et les caséines bovines ont été significatives. Les allergènes purifiés de ces fractions ont donc été testés. Les dégranulations ne sont pas significatives pour les caséines αs1 et κ de vache pour ce sérum. A l'inverse, des dégranulations significatives sont observées pour la βLG et les caséines αs2 et β de vache.

Bien que les dégranulations induites par la β LG et la caséine β soient assez fortes (71 et 65 % de la dégranulation de référence respectivement), les EC50 obtenues pour ces sérums sont assez élevées (310 nM pour la β LG et 39 nM pour la caséine β). Ces valeurs d'EC50 sont parmi les plus élevées obtenues pour ces allergènes par comparaison avec les autres sérums. Elles sont à rapprocher des concentrations en IgE spécifiques parmi les plus basses pour les allergènes bovins (tableau 13). Pour ce même sérum, des dégranulations significatives sont induites par les caséines β et α s2 de chèvre avec des valeurs d'EC50 10^4 à 10^6 fois plus faibles que pour leurs homologues bovines (tableaux 14 et 15). Les résultats obtenus dans ce modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique traduisent donc la plus grande sensibilisation aux allergènes de chèvre et corroborent donc les données cliniques.

Pour les 3 sérums de patients ayant une allergie conjointe aux laits de vache et de chèvre, des dégranulations significatives sont observées pour tous les allergènes des laits de vache et de chèvre. Nous allons analyser les résultats obtenus en nous focalisant dans un premier temps sur les intensités des dégranulations obtenues (MaxD) et, dans un second temps, sur les doses d'allergènes nécessaires pour obtenir les dégranulations (EC50), pour les allergènes du lait de vache et pour les allergènes du lait de chèvre.

**III.2.1.2.c. Analyse des intensités des dégranulations obtenues :
correspondance avec l'intensité de la réponse IgE spécifique**

Les intensités des dégranulations obtenues (MaxD) sont très hétérogènes, que l'on compare les résultats obtenus pour un même allergène avec les différents sérums ou ceux évalués pour le même sérum avec les différents allergènes.

- **Allergènes de vache :**

La comparaison entre les 3 sérums de la dégranulation induite par chaque allergène du lait de vache démontre des intensités faibles avec le sérum BCB83 et plus fortes avec le sérum BCB116 (tableau 14). Curieusement, le sérum BCB116 n'est pas celui qui présente les plus fortes concentrations et taux en IgE spécifiques des allergènes du lait de vache. Ainsi, certains sérums présentant des taux très faibles en IgE spécifiques, comme le sérum BCB116 pour la caséine κ (0,7 UI/mL, correspondant à 0,1 % des IgE totales), entraînent des dégranulations importantes (40% dans cet exemple). D'autres sérums qui présentent des taux forts d'IgE spécifiques, comme le sérum BCB100 pour la β LG (53 UI/mL, correspondant à 5,6% des IgE

totales), entraînent des dégranulations modérées (29% dans cet exemple). Dans ces cas-là, il ne semble donc pas qu'il y ait des corrélations entre les concentrations ou les taux d'IgE spécifiques présents dans les sérums et les intensités des dégranulations obtenues.

L'analyse comparative de la fonctionnalité des différents allergènes bovins souligne des intensités de dégranulation plus fortes pour les caséines que pour la β LG. Ces différences sont retrouvées au niveau de l'intensité des réponses des IgE spécifiques qui sont également plus fortes contre les caséines que contre la β LG. Pour le sérum BCB83, les intensités de dégranulations sont assez homogènes entre les différentes caséines purifiées. Pour les 2 autres sérums, la caséine α 2 ou la caséine β sont les caséines qui induisent les intensités de dégranulations les plus fortes. Par contre, ces résultats ne sont pas corrélés aux concentrations en IgE spécifiques des allergènes correspondants dans les sérums (tableaux 13 et 14).

- **Allergènes de chèvre :**

Des intensités de dégranulation fortes sont observées avec les protéines de chèvre pour les deux sérums de patients spécifiquement allergiques au lait de chèvre. Les plus fortes intensités de dégranulation sont cependant observées avec le sérum BCB116 qui présente les plus forts taux en IgE spécifiques des allergènes du lait de chèvre. Cependant, ces correspondances sont peu souvent trouvées. A titre d'exemple, le sérum BCB26 présente une réponse IgE très faible envers la caséine κ (5 UI/mL représentant 0,9% des IgE totales). C'est cependant le sérum pour lequel l'intensité de la dégranulation induite par cet allergène est la plus forte (61%). A l'inverse, aucune dégranulation spécifique n'est observée avec la caséine α 2 pour le sérum BCB100 qui contient pourtant 25 UI/mL d'IgE spécifiques de cet allergène, correspondant à 2,6% des IgE totales (tableaux 13 et 15).

Si l'on compare maintenant les résultats entre allergènes de chèvre, on observe que les intensités des dégranulations obtenues sont plus fortes pour la β LG que pour la caséine, tandis que les concentrations en IgE spécifiques de la β LG sont beaucoup plus faibles que les concentrations en IgE spécifiques des protéines de la fraction caséine. Il ne semble donc pas qu'il y ait une corrélation entre les niveaux d'IgE spécifiques présents dans les sérums (soit en quantité d'IgE, soit en pourcentage par rapport aux IgE totales) et les intensités des dégranulations obtenues pour les allergènes du lait de chèvre. Notons que les intensités de dégranulation sont plus importantes pour les caséines α 2 et β .

Les intensités de dégranulation des allergènes des laits de vache et de chèvre pour les sérums issus de patients ayant une allergie aux laits des deux espèces sont plus importantes

suite à l'activation des cellules sensibilisées par la β LG de chèvre. Pour les caséines entières et les caséines purifiées, les dégranulations sont équivalentes. La seule exception est observée pour le sérum BCB100 pour lequel aucune dégranulation n'est induite pour la caséine α 2 de chèvre alors qu'une intense dégranulation est obtenue pour celle de vache (70%).

Les dégranulations se sont avérées être plus fortes pour les caséines comparées à la β LG pour les allergènes de vache tandis que l'inverse est observé pour les allergènes de chèvre. Les caséines α 2 et β , de chèvre comme de vache, sont les protéines de la fraction caséine qui induisent les dégranulations les plus intenses. La β LG de chèvre a donné des dégranulations plus intenses que celle de vache alors que pour les caséines, il n'y a globalement pas de différences entre les allergènes des laits de vache et de chèvre. Finalement, pour la majorité des allergènes du lait de chèvre comme avec ceux du lait de vache, le lien entre les niveaux en IgE spécifiques des allergènes dans les sérums et les intensités des dégranulations induites est peu souvent significatif.

III.2.1.2.d. Doses d'allergènes induisant les dégranulations

Afin de comparer les doses des différents allergènes nécessaires pour induire la dégranulation, les valeurs d'EC50 obtenues pour chacun des sérums et pour les différents allergènes des laits de vache et de chèvre ont été calculées. De façon similaire aux observations sur les intensités de dégranulations, les valeurs d'EC50 obtenues s'avèrent très hétérogènes.

- **Allergènes de vache :**

Aucun sérum ne se distingue réellement pour les différents allergènes du lait de vache (tableau 14). Par exemple, le sérum BCB116 a les EC50 les plus faibles pour les caséines α 2 et κ , alors qu'il a celle la plus forte pour la caséine α 1. En réalité, une très forte hétérogénéité des valeurs d'EC50 obtenues pour un allergène donné est observée. La figure 29 représente les valeurs d'EC50 obtenues avec les sérums testés pour les allergènes des laits de vache et de chèvre. Les valeurs d'EC50 exprimées en nM sont représentées sur une échelle logarithmique. Cette figure permet de visualiser la très grande disparité des EC50 obtenues pour ces sérums. Pour la fraction totale de caséines, les EC50 varient de 7 nM à 100 μ M. Ainsi par exemple, près de 10^4 fois plus de caséines sont nécessaires pour induire la dégranulation pour le sérum

BCB116 que pour le sérum BCB100. Les EC50 obtenues pour la β LG sont cependant plus homogènes (facteur 100 entre les deux extrêmes) et encore plus pour la caséine κ (facteur 10 entre les deux extrêmes).

Les différences des valeurs moyennes d'EC50 sont également très prononcées entre allergènes. La β LG induit des dégranulations pour des doses assez fortes (autour de 0,1 pM) alors que les caséines induisent des dégranulations à des doses beaucoup plus faibles (inférieures à 100 pM). Cette disproportion des valeurs d'EC50 entre la β LG et les caséines atteint même une valeur de 10^6 pour le sérum BCB83. Les résultats sont également très hétérogènes entre les différentes caséines purifiées. La valeur moyenne d'EC50 la plus forte est obtenue avec la caséine α s2 et la plus faible avec la caséine β . Toutefois, la forte dispersion des valeurs rend les interprétations difficiles. Par exemple, pour le sérum BCB100, l'EC50 obtenue pour la caséine α s2 est 2 fois plus importante que celle obtenue pour la caséine α s1. En revanche, pour le sérum BCB116, l'EC50 obtenue pour la caséine α s2 est pratiquement 2 millions de fois plus faible que celle obtenue pour la caséine α s1.

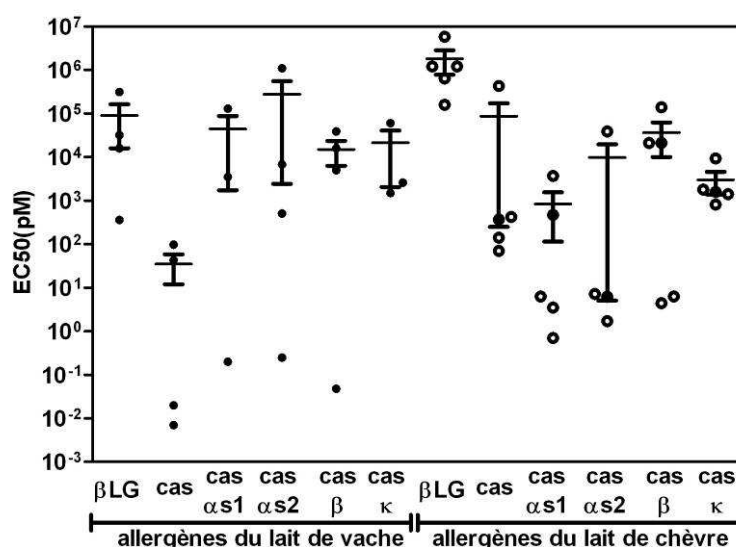


Figure 29 : Comparaison des valeurs d'EC50 obtenues après activation des cellules par la β LG, la fraction caséine entière et les différentes caséines (α s1, α s2, β et κ) des laits de vache et de chèvre.

- **Allergènes de chèvre :**

Pour les allergènes du lait de chèvre, une très forte hétérogénéité est également observée entre sérums (tableau 15). Les sérums BCB26 et BCB96 de patients allergiques au lait de chèvre mais tolérant le lait de vache sont ceux pour lesquels les EC50 sont les plus faibles pour les caséines α s1 et α s2. A l'inverse, le sérum BCB83 semble être le moins réactif,

avec des valeurs d'EC50 calculées pour les différents allergènes du lait de chèvre relativement élevées. On observe également une très forte hétérogénéité des valeurs d'EC50 obtenues pour un allergène donné (figure 29). Pour la caséine entière, les EC50 varient de 70 pM à 430 nM. Plus de 5000 fois plus de caséine entière sont donc nécessaires pour induire la dégranulation pour le sérum BCB26 que pour le sérum BCB83. Comme observé pour les allergènes du lait de vache, les EC50 obtenues pour la β LG et la caséine κ caprines sont plus homogènes (facteur 10 entre les deux extrêmes).

La β LG de chèvre induit des dégranulations pour des doses assez fortes (autour de 1 μ M), bien supérieures à celles nécessaires pour la caséine entière (de l'ordre de 150 pM). Les différences entre caséines sont également très variables pour le lait de chèvre. Par exemple, pour le sérum BCB26, l'EC50 obtenue pour la caséine α 2 est 10 fois plus importante que celle obtenue pour la caséine α 1. En revanche, pour le sérum BCB116, l'EC50 obtenue pour la caséine α 2 est pratiquement 600 fois plus faible que celle obtenue pour la caséine α 1.

Si l'on compare les allergènes des laits de vache et de chèvre pour les sérums ayant une allergie aux laits des deux espèces, les protéines caprines nécessitent généralement des doses plus fortes que leurs homologues bovines pour atteindre 50% de la dégranulation. Néanmoins, pour le sérum BCB100, les EC50 sont plus élevées pour les caséines α 1 et κ de vache que pour les caséines correspondantes caprines.

En conclusion, en regard des EC50, les caséines semblent être plus réactives que la β LG dans ce modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique, que ce soit pour le lait de vache ou de chèvre. Pour les sérums de patients allergiques aux laits de vache et de chèvre, les allergènes bovins induisent généralement des dégranulations pour des concentrations plus faibles que les allergènes du lait de chèvre. Toutefois, du fait de la forte dispersion des valeurs d'EC50 et du faible nombre de patients analysés, les interprétations ne sont malheureusement qu'indicatives.

III.2.1.2.e. Conclusions et discussion

Nos études portant sur l'allergie au lait ont été enrichies par le développement du test de dégranulation de mastocytes de rat après sensibilisation à l'aide d'IgE humaines. La méthodologie appliquée à un grand nombre d'allergènes du lait avec un groupe hétérogène de

patients allergiques a conforté des données diverses de la littérature. Les tests effectués nous permettent d'observer une grande variabilité de la dégranulation par des allergènes du lait, autant au niveau des intensités qu'au niveau des doses nécessaires à son induction. Cette hétérogénéité des dégranulations se retrouve pour un même sérum si l'on compare les différents allergènes ou pour un même allergène si l'on compare les différents sérums testés.

Une telle diversité pourrait correspondre à la forte variabilité de la réponse IgE aux protéines du lait observée lors de tests enzymo-immunologiques [206;360]. Cependant, pour les différents allergènes des laits de vache et de chèvre, nous n'avons pas observé de corrélation entre les taux d'IgE spécifiques des allergènes dans les sérums et les dégranulations (MaxD et EC50) induites par ces allergènes. Certains sérums induisent des dégranulations significatives alors que les teneurs en IgE spécifiques *vs* IgE totales sont de 0,5%. A l'inverse, d'autres sérums ayant des taux d'IgE spécifiques *vs* IgE totales supérieurs à 2,6% n'ont pas induit de dégranulation spécifique dans ce test cellulaire. La dégranulation ne serait donc pas seulement dépendante d'une quantité d'IgE spécifiques impliquées mais également de leurs affinités envers l'allergène.

Au-delà de cette hétérogénéité, quelques tendances se dessinent :

- L'étude a impliqué les sérums de deux patients allergiques au lait de chèvre qui tolèrent les produits laitiers de vache. Les IgE de ces patients ne reconnaissent pas ou peu les allergènes du lait de vache [36]. Pour des cellules sensibilisées avec les IgE de tels patients, les dégranulations induites par les allergènes bovins ne sont pas significatives pour la plupart, ou nécessitent des doses bien supérieures aux équivalents caprins. A l'inverse, pour les patients allergiques aux laits de vache et de chèvre, les allergènes bovins induisent des dégranulations à des concentrations souvent plus faibles que les allergènes caprins.
- Par ailleurs, les doses nécessaires pour induire la dégranulation dans notre modèle cellulaire montrent que les caséines semblent plus réactives que la β LG, quel que soit le patient étudié ou la source allergénique choisie, vache ou chèvre. Nos résultats sont en accord avec des analyses précédentes effectuées à partir de dosages IgE et d'immunoempreintes. L'allergénicité de la caséine entière a été démontrée par Docena et coll. [360;375]. Shek et coll. ont également montré que les fréquences de reconnaissance des différentes caséines sont plus élevées que celles de la β LG qui est de 36%. Dans cette étude, les taux d'IgE spécifiques observés étaient plus élevés pour les caséines α et β que pour les protéines du lactosérum [207]. Nos résultats, en accord avec ces travaux, montrent que chacune des différentes caséines induit des dégranulations à des doses généralement plus faibles que les protéines du

lactosérum. Par contre, la comparaison du potentiel de dégranulation entre caséines ne permet pas de définir une règle. Les différentes données de la littérature avaient montré un potentiel allergénique variable des caséines, pouvant dépendre notamment de la population étudiée et des paramètres d'analyse adoptés. Bernard et coll. ont montré que 85% des patients allergiques au lait de vache ayant une réponse IgE à la caséine entière reconnaissent chacune des quatre caséines purifiées. De plus, les taux d'IgE spécifiques sont globalement plus élevés pour les caséines $\alpha 1$ et β [206]. Nos dosages des IgE spécifiques sont en accord avec cette étude, avec, en plus, une forte réponse contre la caséine $\alpha 2$ dans notre population. Dans ce sens, Natale et coll. ont montré que 90% des patients allergiques au lait de vache reconnaissent la caséine $\alpha 2$, 55% la caséine $\alpha 1$, 50% la caséine κ et 15% la caséine β [376]. Plus récemment, Gaudin et coll. ont montré que 50% des IgE des patients allergiques au lait de vache reconnaissent la caséine $\alpha 1$, 31% la caséine $\alpha 2$, 28% la caséine β et 31% la caséine κ [377]. Dans notre test de dégranulation, aucune caséine ne semble se distinguer pour provoquer des dégranulations. Pour les deux sérums de patients allergiques au lait de chèvre sans allergie au lait de vache, les caséines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ semblent cependant être plus réactives que les deux autres caséines β et κ . En dépit de cette particularité, l'ensemble de nos travaux montrent que toutes protéines du lait et particulièrement toutes les caséines présentent un pouvoir de dégranulation. Chacune d'entre elles serait donc impliquée dans la réaction allergique provoquée par le lait.

III.2.2. Etude des allergènes purifiés de l'arachide

Le modèle cellulaire a également été appliqué à la caractérisation des réponses induites par les allergènes purifiés de l'arachide, autre modèle d'étude de la relation structure/allergénicité au laboratoire. A partir des résultats de cette étude, confirmés par d'autres observations, nous avons cherché à déterminer l'influence que pouvaient avoir les caractéristiques cliniques et sérologiques des sérums sur leur capacité à induire la dégranulation des cellules RBL SX-38.

III.2.2.1. Comparaison du potentiel de dégranulation de différents allergènes purifiés de l'arachide

L'analyse a été réalisée par la sensibilisation des cellules avec des IgE immunopurifiées provenant de 12 sérums individuels et le pool de sérums de patients allergiques à l'arachide. Des cellules ont été sensibilisées en parallèle par le pool de sérums de patients allergiques au lait afin de constituer un contrôle de spécificité. Toutes les cellules ont ensuite été activées par des gammes de concentration d'extrait protéique brut d'arachide (EPBA) ou des allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 (ou polymères de glycinines), Ara h 6 et un fragment « naturel » de Ara h 3.

III.2.2.1.a. Caractéristiques des sérums utilisés

Les concentrations en IgE totales et spécifiques de l'EPBA ou des différents allergènes contenus dans les 12 sérums individuels et les pools de sérums de patients allergiques à l'arachide ou au lait ont été testées par EAST. Les résultats de ces dosages et les caractéristiques cliniques des patients sont récapitulés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Dosages des IgE totales et spécifiques des allergènes de l'arachide dans les sérums.

Sérums (symptomatologie)	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques (UI/mL)						% d'IgE spécifiques de l'EPBA / IgE totales
		EPBA	globuline 7S	glycinines		albumines 2S		
			Ara h 1	Ara h 3	fragment de Ara h 3	Ara h 2	Ara h 6	
51 (LM)	2450	1450	790	870	810	790	730	59
470 (LM)	10800	2190	1370	1840	1490	1170	1160	20
488 (LM)	470	320	160	180	81	47	75	68
658 (LM)	710	23	16	25	15	11	14	3
92 (S)	1170	790	380	550	200	340	260	68
200 (S)	3160	350	180	250	200	125	145	11
314 (S)	1540	110	51	72	70	44	40	7
437 (S)	380	180	94	150	91	52	70	47
445 (S)	490	160	100	160	130	64	90	33
577 (S)	560	250	120	200	110	51	80	45
609 (S)	730	390	250	280	220	120	190	53
631 (S)	630	160	90	130	77	41	53	25
pool de sérums de patients allergiques à l'arachide	960	160	88	130	120	53	72	17
pool de sérums de patients allergiques au lait	1320	-	-	-	-	-	-	-

Symptomatologie : LM : légère à modérée, S : sévère
- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL).

Lors du dosage par EAST, aucune IgE spécifique n'a pu être détectée dans le pool de sérums de patients allergiques au lait. Ces résultats ont été confirmés dans l'autre format de dosage, par capture des IgE, s'assurant ainsi que ce pool de sérums constitue un bon contrôle de spécificité pour la dégranulation. A l'inverse, les 12 sérums de patients allergiques choisis pour cette étude ont des IgE spécifiques de tous les allergènes testés. Notons qu'il n'y a pas de variabilité importante dans l'intensité des réponses IgE aux différents allergènes chez un même patient. Un patient fortement sensibilisé présente des fortes réponses IgE à tous les allergènes testés (ex. : n° 470). A l'inverse un patient plus modérément sensibilisé présente des réponses IgE modérées à tous les allergènes testés (ex. n° 658). L'intensité de cette sensibilisation ne semble pas corrélée à la symptomatologie du patient dans la population d'étude.

Par contre, une grande variabilité est observée dans les concentrations en IgE spécifiques de l'EPBA pour notre population d'étude. Ces concentrations s'étalent entre 23 et 2200 UI/mL, représentant 3 à 68% des IgE totales. Les concentrations en IgE spécifiques de Ara h 1 et de Ara h 3 sont globalement 25% plus fortes que celles des IgE spécifiques de Ara h 2 et de Ara h 6. Les concentrations en IgE dirigées contre le fragment de Ara h 3, un peptide de 11900 kDa dérivé de Ara h 3, présentent la même intensité que celles observées contre les albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6).

Du fait des contraintes du test cellulaire, la population de patients allergiques sélectionnée pour cette étude n'est malheureusement pas représentative de la population générale de patients allergiques à l'arachide. Les sérums présentés ici ont des titres en IgE totales particulièrement forts (de 380 à 10800 UI/mL). Ils ont été privilégiés par rapport à des sérums dont les concentrations en IgE totales sont plus faibles afin de limiter le volume de sérums nécessaire à l'étude de tous les allergènes de l'arachide dans le test de dégranulation. La population d'étude est de plus composée en majorité de patients ayant des concentrations d'IgE spécifiques élevées.

III.2.2.1.b. Profils des courbes de dégranulation

Les cellules RBL SX-38 sensibilisées avec les IgE immunopurifiées du pool de sérums de patients allergiques au lait activées par les allergènes d'arachide, n'ont pas induit de dégranulation significative. A l'inverse, les sensibilisations des cellules RBL SX-38 avec les différents sérums de patients allergiques à l'arachide ont conduit à une dégranulation significative avec tous les allergènes testés. Un exemple des courbes de dégranulation obtenues pour le sérum n° 445 est montré figure 30.

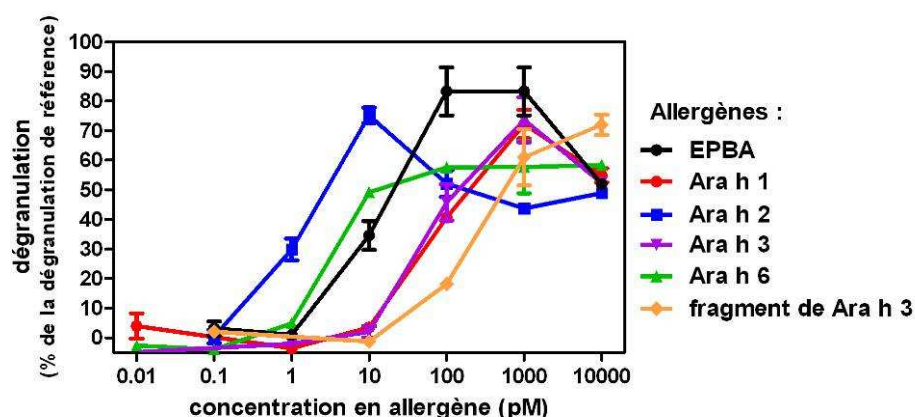


Figure 30 : Libération de β -hexosaminidase des cellules RBL SX-38 sensibilisées avec le sérum n° 445 et activées avec l'EPBA ou les différents allergènes purifiés de l'arachide.

La libération de β -hexosaminidase augmente en fonction des concentrations croissantes en allergène pour atteindre une valeur maximale. Les dégranulations stagnent ou diminuent quand les concentrations en allergènes augmentent davantage. Pour chaque sérum et allergène, le maximum de dégranulation (MaxD) et l'EC50, c'est-à-dire la quantité d'allergène nécessaire pour induire 50% de ce maximum de dégranulation, ont été calculés en modélisant les courbes de dégranulation obtenues. Un cas particulier a été observé pour les dégranulations induites par Ara h 6. Pour 6 des sérums individuels (n° 92, 200, 437, 488, 609 et 631) et pour le pool de sérums de patients allergiques, la courbe de dégranulation obtenue après activation par Ara h 6 s'est avérée être bimodale (figure 31 : courbe de dégranulation obtenue avec le sérum n° 92).

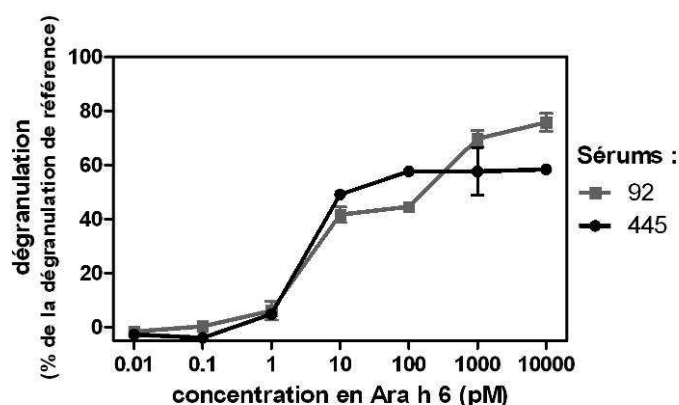


Figure 31 : Dégranulation spécifique induite par Ara h 6 de cellules RBL SX-38 sensibilisées avec les sérums n° 92 et 445.

L'augmentation de la concentration en Ara h 6 permet d'atteindre un premier plateau de dégranulation (1^{er} pic), puis après une nouvelle augmentation de la concentration en allergène, un nouveau pic est observé. Pour ces courbes particulières de dégranulation, nous avons défini 2 MaxD ainsi que 2 EC50 correspondants. Pour un sérum, seul le second pic a été observé (sérum n°658). Notons que ce sérum correspond à celui ayant les plus faibles concentrations et taux d'IgE spécifiques.

Ces courbes de dégranulation bimodales obtenues pour l'Ara h 6 pourraient être expliquées par la présence et la mobilisation successive d'IgE spécifiques d'affinité décroissante dans certains sérums. Cette hétérogénéité d'affinité pourrait trouver son origine dans l'existence de réactivités croisées entre les albumines 2S de l'arachide, Ara h 2 et Ara h 6. En effet, ces protéines présentent des structures conservées qui peuvent conduire à une immunoréactivité croisée. Koppelman et coll. ont ainsi montré par des tests d'inhibition d'immunoempreintes que Ara h 2 peut inhiber complètement la liaison IgE-Ara h 6 [175]. Par ailleurs, il a également été montré que la liaison IgE-Ara h 2 peut être inhibée par Ara h 6, mais de façon moins prononcée. Une petite portion de Ara h 2 demeure capable de lier les IgE même en présence de fortes concentrations en Ara h 6 [175]. Par conséquent, lors de la dégranulation induite par Ara h 6, les IgE de plus faible affinité qui sont mobilisées pendant la seconde phase de la dégranulation pourraient correspondre à des IgE spécifiques de Ara h 2, mais reconnaissant également Ara h 6. La plus faible affinité de cette liaison, et/ou la moindre quantité d'IgE impliquées, expliquerait ce pic tardif. L'implication d'une telle population est confortée par le fait que l'intensité de la dégranulation obtenue par Ara h 6 au second pic est équivalente à celle observée pour Ara h 2 (voir tableau 17). La réciprocité partielle de la réactivité croisée entre Ara h 2 et Ara h 6 est retrouvée dans le test étant donné que pour ces mêmes sérums, les dégranulations induites par Ara h 2 ont tendance à augmenter à nouveau dans un second temps pour des concentrations très élevées.

L'intensité de la dégranulation (MaxD) et la dose pour laquelle cette dégranulation est observée (EC50) sont rapportés pour les différents sérums et allergènes purifiés testés dans le tableau suivant (tableau 17).

Tableau 17 : Maximum de dégranulation (MaxD) et EC50 obtenus avec des cellules RBL SX-38 sensibilisées avec des IgE immunopurifiées de sérums humains de patients allergiques à l'arachide, et activées avec l'EPBA, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, et le fragment de Ara h 3.

Sérums (symptomatologie)	EPBA		globuline 7S		glycinines				albumines 2S					
			Ara h 1		Ara h 3		fragment de Ara h 3		Ara h 2		Ara h 6 (1 ^{er} pic)		Ara h 6 (2 nd pic)	
	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)	MaxD (%)	EC50 (pM)
51 (LM)	82	2,2	75	190	72	43	68	150	56	2,3	66	2,7		
470 (LM)	66	17	85	200	66	100	58	270	67	2,2	49	2,9		
488 (LM)	95	9,4	78	8	72	18	71	130	58	1,5	56	1,2	67	3020
658 (LM)	24	40	18	220	23	170	23	3090	32	3,8	0		24	1220
92 (S)	98	7	91	74	93	50	95	460	97	1,3	47	2,8	78	380
200 (S)	59	18	41	160	44	130	43	950	35	1,9	10	2,6	32	700
314 (S)	43	25	43	200	42	180	34	440	37	2,4	31	7,9		
437 (S)	79	21	58	230	62	90	56	720	54	3,2	30	2,4	61	1480
445 (S)	89	13	75	85	76	64	74	260	80	1,4	60	3,2		
577 (S)	86	1,2	72	22	68	22	74	200	65	1,9	47	3,8		
609 (S)	89	1,3	79	18	82	55	70	150	48	2,2	24	0,7	42	760
631 (S)	70	1,5	64	140	69	65	60	310	71	2	51	1,8	58	360
moyenne (n=12)	73	13	65	129	64	82	61	594	58	2,2	39	2,9	52	1131
médiane (n=12)	80	11,2	73	150	68	65	64	290	57	2,1	47	2,7	58	760
pool arachide	69	6,4	60	130	59	140	52	440	44	2,1	29	2,7	47	1490

Pool arachide : pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide.

Les MaxD sont exprimés en pourcentage de dégranulation par rapport à la dégranulation de référence.

La quantité d'allergène donnant 50% de ce Max (EC50) est exprimée en pmol/L.

Symptomatologie : LM : légère à modérée, S : sévère.

Nous allons analyser les résultats obtenus en nous focalisant dans un premier temps sur les intensités des dégranulations obtenues (MaxD) et, dans un second temps, sur les doses d'allergènes nécessaires pour obtenir les dégranulations (EC50).

III.2.2.1.c. Intensités des dégranulations

Même si cela n'est pas significatif, les moyennes des MaxD les plus fortes ont été obtenues avec Ara h 1 et Ara h 3 (65 et 64% de la dégranulation de référence), ce qui est corrélé avec les concentrations les plus fortes en IgE spécifiques (tableau 16). A l'inverse, les

MaxD obtenues avec Ara h 6 ont été les plus faibles (en moyenne 39% de la dégranulation de référence si l'on considère les dégranulations obtenues au 1^{er} pic). Cependant, les courbes bimodales obtenues avec cet allergène pour certains sérums ont rendu les comparaisons difficiles. En regardant les valeurs du 2nd pic, la moyenne atteint 51%. Pour Ara h 2 et le fragment de Ara h 3, les moyennes ont été de 58 et 60% respectivement. La comparaison de ces moyennes reproduit l'ordre observé individuellement pour chaque sérum.

A l'inverse, pour un même allergène, nous avons observé une grande variabilité des MaxD selon les sérums utilisés pour sensibiliser les cellules. Par exemple, les MaxD sont échelonnés de 24 à 98% pour l'EPBA. Rappelons que dans ce test cellulaire, les sérums sont tous incubés sur les cellules à une quantité fixe de 1 UI d'IgE totales par puits. Nous avons donc analysé si les intensités des dégranulations obtenues étaient corrélées au pourcentage d'IgE spécifiques d'un allergène donné *vs* IgE totales, ce pourcentage représentant finalement la quantité d'IgE spécifiques incubées sur les cellules. La figure 32 présente les résultats des corrélations obtenues pour les différents allergènes.

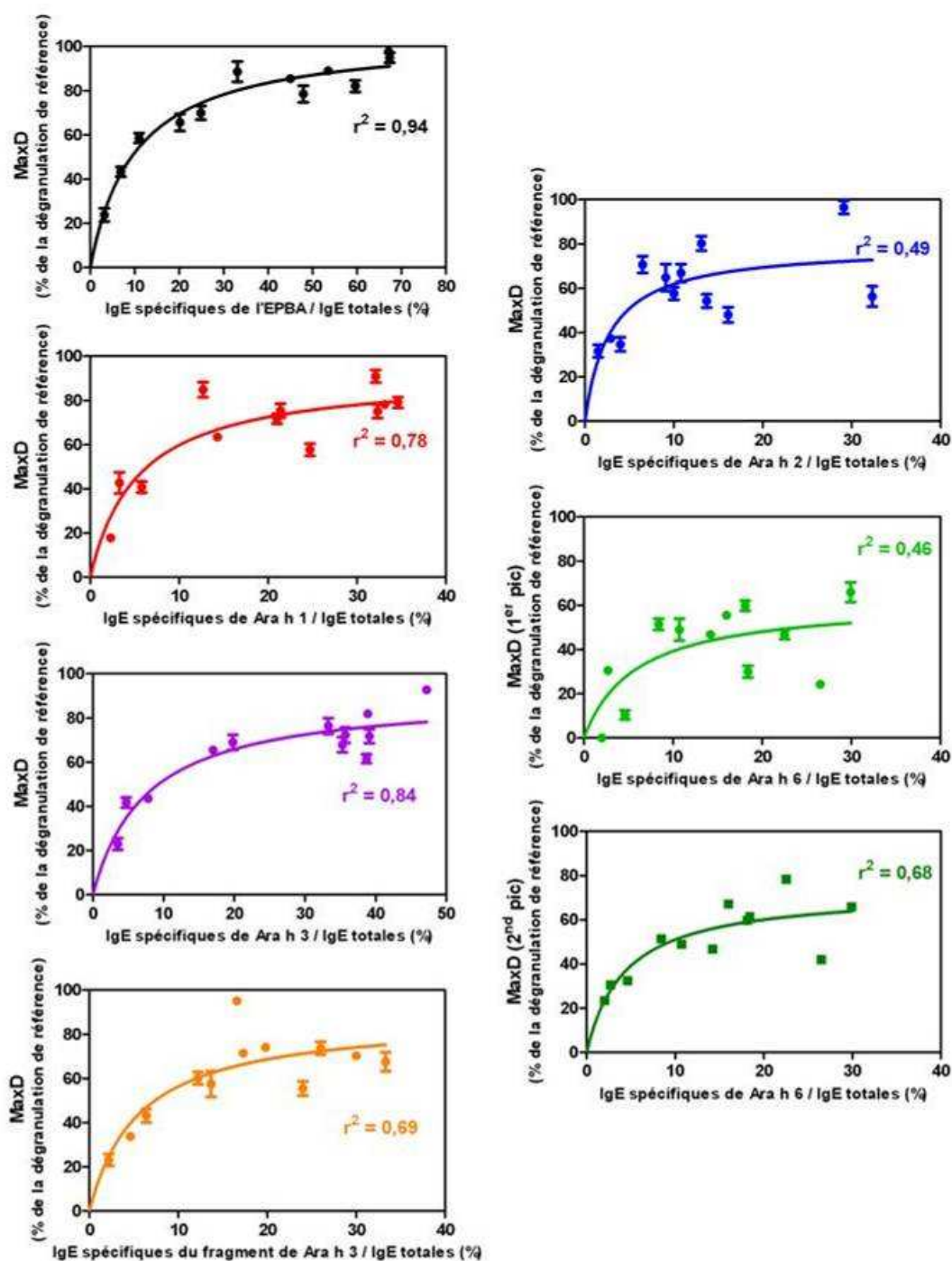


Figure 32 : Corrélations entre la proportion d'IgE spécifiques / IgE totales et les maximum de dégranulation (MaxD) induits par l'EPBA et les différents allergènes purifiés Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 (1er et 2nd pic) et le fragment de Ara h 3.
Les MaxD sont exprimés en pourcentage de la dégranulation de référence.

Une corrélation positive forte est observée pour les dégranulations spécifiques induites par l'EPBA, Ara h 1, Ara h 3 et le fragment de Ara h 3 ($r^2 = 0,94$, $0,68$, $0,84$ et $0,69$ respectivement). A l'inverse, cette corrélation n'est pas significative dans les cas des

dégranulations induites par les albumines 2S, Ara h 2 et Ara h 6 (1^{er} pic) ($r^2 = 0,49$ et $0,46$ respectivement). Pour Ara h 6, si l'on tient compte des MaxD obtenus au 2nd pic pour les 6 sérums concernés, et au 1^{er} pic pour les autres, la corrélation est alors significative ($r^2=0,68$). Les liens entre la capacité des sérums à dégranuler et leurs pourcentages d'IgE spécifiques vs IgE totales seront discutés plus finement dans le paragraphe III.2.2.2.b.

Ainsi, l'intensité des dégranulations qui ont été obtenues pour les 12 sérums testés et le pool est dans l'ensemble corrélée aux taux d'IgE spécifiques vs IgE totales de ces sérums, contrairement à ce que nous avons observé dans le cadre de l'allergie au lait.

III.2.2.1.d. Doses d'allergènes induisant les dégranulations

En ce qui concerne les allergènes, un bon indicateur de leur potentiel allergénique est la dose nécessaire pour induire le déclenchement de la réaction allergique. Dans notre modèle, cette dose a été déterminée par le calcul des EC50 qui sont rapportées dans le tableau 17. Nous avons reporté sur la figure 33 les valeurs d'EC50 obtenues pour les 12 sérums individuels et pour les différents allergènes testés. Les EC50 sont exprimées en picomolaire afin de pouvoir comparer le potentiel des différents allergènes en termes de nombre de molécules nécessaires à induire la dégranulation.

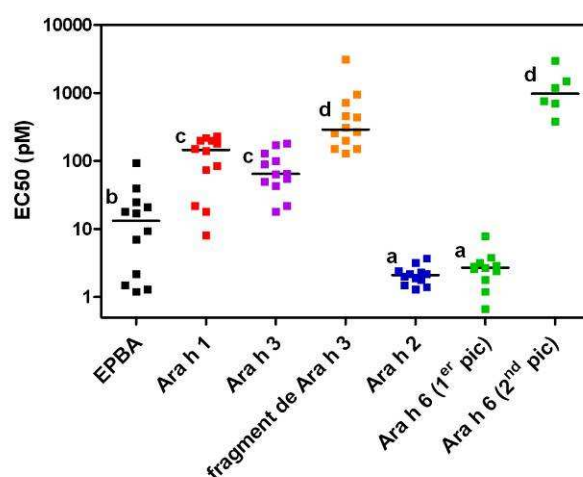


Figure 33 : Comparaison des valeurs d'EC50 obtenues après activation des cellules sensibilisées par les 12 sérums par l'EPBA, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 et le fragment de Ara h 3.

a, b, c et d indiquent une différence significative d'un groupe par rapport aux autres en utilisant une analyse de variance suivie du test de Tukey ($p<0,05$).

Les EC50 obtenues avec l'EPBA, Ara h 1, Ara h 3 montrent une relativement grande variabilité. A l'inverse, les EC50 obtenues pour Ara h 2 et Ara h 6 (en considérant le 1^{er} pic)

sont plus homogènes. Les EC50 obtenues pour Ara h 2 et Ara h 6 sont significativement plus faibles que celles obtenues après activation par les autres allergènes d'arachide. Les médianes sont respectivement de 2,1 et 2,7 pM pour Ara h 2 et Ara h 6 alors que pour l'EPBA, Ara h 3, Ara h 1 et le fragment de Ara h 3, les médianes sont respectivement de 11, 65, 150 et 290 pM. En fonction du sérum, 5 à 100 fois plus de Ara h 1 et de Ara h 3 que de Ara h 2 ou Ara h 6 sont nécessaires pour obtenir une dégranulation.

Même si les plus faibles valeurs d'EC50 pour tous les allergènes testés ont été obtenues pour des sérums qui se caractérisent par une forte proportion en IgE spécifiques vs IgE totales (sérums n° 51, 92, 488, 577 et 609) et qu'à l'inverse, les sérums qui ont induit les plus fortes valeurs d'EC50 ont un faible pourcentage d'IgE spécifiques vs IgE totales (sérums n° 314 et 658), cette corrélation n'est pas forcément retrouvée pour un même allergène entre sérums avec le même taux d'IgE spécifiques. Par exemple les sérums 437 et 577 ont des taux d'IgE spécifiques de l'EPBA de 47 et 45% des IgE totales respectivement. Ils présentent pourtant des valeurs d'EC50 qui diffèrent d'un facteur 17 (21 pM et 1,2 pM respectivement). Des facteurs autres que les taux d'IgE spécifiques entrent donc en jeu pour expliquer l'induction d'une dégranulation à des concentrations différentes selon les allergènes, l'affinité des IgE pour les allergènes pourrait être un de ces facteurs.

Nos résultats démontrent que les albumines 2S ont une forte capacité à induire le pontage des IgE et à induire la dégranulation. A l'inverse Ara h 1 et Ara h 3 sont moins actifs puisque de plus fortes doses de ces allergènes sont requises pour obtenir des dégranulations similaires. Une hypothèse pourrait être que le faible encombrement stérique de petites molécules faciliterait leur accès simultané à plusieurs molécules d'IgE fixées sur les cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inclus le fragment de Ara h 3 dans notre étude. Il s'agit d'une molécule d'une taille comparable à celles de Ara h 2 et Ara h 6, et contre laquelle les concentrations en IgE spécifiques sont équivalentes à celles observées contre les albumines 2S (tableau 16). Cependant, le fragment de Ara h 3 démontre un très faible potentiel de dégranulation, suggérant que la taille des albumines 2S n'explique pas leur forte activité biologique dans notre test.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Palmer et coll. qui ont montré que 33 fois plus de molécules de Ara h 1 que de molécules de Ara h 2 sont nécessaires pour obtenir la même dégranulation [184]. Dans notre étude, nous avons observé, en moyenne, que 60 fois plus de molécules de Ara h 1 que de molécules de Ara h 2 sont nécessaires pour obtenir la

même dégranulation. Ces résultats sont également concordants avec des tests de dégranulation de basophiles humains, qui démontrent que Ara h 2 est un allergène déclenchant plus puissant que Ara h 1 et Ara h 3 [174;378]. Lehmann et coll. ont par ailleurs comparé la réactivité de Ara h 2 et de Ara h 6 dans un test de dégranulation sur cellules RBL 30/25, exprimant uniquement la chaîne α humaine. Dans ce test Ara h 2 induisait des dégranulations plus fortes et à des doses plus faibles que Ara h 6 [371], ce que nous n'avons pas confirmé dans notre étude. Dans une étude récente, McDermott et coll. ont montré que Ara h 2 avait un rôle majeur dans l'allergie à l'arachide. La déplétion en Ara h 2 d'un extrait protéique d'arachide induisait une augmentation des EC50 obtenues dans un test de dégranulation de cellules RBL SX-38 et dans un test de dégranulation de basophiles, augmentations respectives d'un facteur de 1,7 et 0,6 (n=12) [379]. Des études comparant l'activité biologique des allergènes d'arachide par tests cutanés ont montré que Ara h 2 et Ara h 6 sont les allergènes les plus fréquemment reconnus et induisant les réactions cutanées les plus fortes [163;173;174]. Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules RBL SX-38 sont donc en accord avec ces observations cliniques.

Toutes ces études démontrent donc le fort potentiel déclenchant des albumines 2S comparées aux autres allergènes de l'arachide. Cette observation est surprenante si l'on considère les proportions des différents allergènes dans l'EPBA ; c'est-à-dire 14%, 6,5%, 50% et 4,5% des protéines totales respectivement pour Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 et Ara h 6 [355]. Même en tenant compte des proportions dans la graine de l'arachide, les différences entre les valeurs d'EC50 sont telles que les albumines seraient toujours les plus réactives des allergènes de l'arachide. Les albumines 2S semblent donc jouer un rôle majeur dans la réaction allergique à l'arachide.

III.2.2.2.Liens entre capacité à dégranuler et caractéristiques immunochimiques des sérums et cliniques des patients

III.2.2.2.a.Pourcentages en IgE spécifiques vs IgE totales des sérums et intensités de dégranulation

Dans cette étude, nous avons pu constater qu'il y avait un lien entre les pourcentages en IgE spécifiques vs IgE totales des sérums et l'intensité de la dégranulation spécifique obtenue pour la majorité des allergènes testés. Nous avons par ailleurs pu observer que des sérums de patients allergiques à l'arachide n'ayant que très peu d'IgE spécifiques de

l'arachide n'induisent pas de dégranulation spécifique significative. Ainsi, parmi les sérums testés, celui qui induit les dégranulations les plus faibles (sérum n° 658), entre 18 et 32 % de la dégranulation de référence, est caractérisé par des taux d'IgE spécifiques variant selon l'allergène concerné de 1,5 à 3,5% des IgE totales.

Nous avons donc réalisé une expérience de dégranulation en diminuant artificiellement le pourcentage d'IgE spécifiques vs IgE totales d'un sérum (n° 263, contenant 55% d'IgE spécifiques / IgE totales) par ajout dosé de molécules IgE du standard utilisé comme étalon dans les dosages d'IgE. Le standard utilisé provient de WHO IUIS et ne présente pas d'IgE spécifiques de l'arachide. Dans ces tests, la quantité finale d'IgE totales incubées par puits est maintenue à 1 UI, et c'est le pourcentage en IgE spécifiques qui est variable. Les cellules sont ensuite activées avec la concentration en EPBA induisant une dégranulation maximale pour le sérum sans ajout d'IgE standard (35 ng/mL) (figure 34).

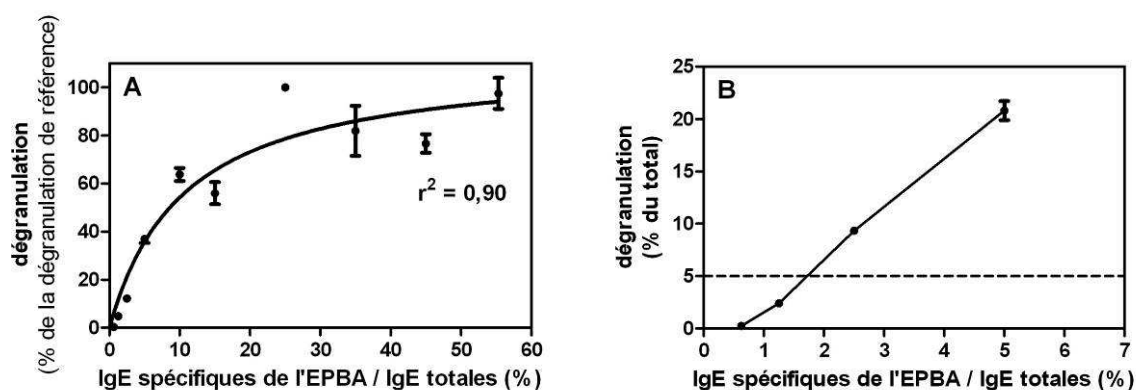


Figure 34 : Effet du pourcentage en IgE spécifiques vs IgE totales sur la dégranulation de cellules RBL SX-38 par l'EPBA par ajout dosé d'IgE non spécifiques de l'arachide à des IgE immunopurifiées du sérum n° 263.

A : La dégranulation est exprimée par rapport à la dégranulation de référence
B : La dégranulation est exprimée en fonction du contenu total en β -hexosaminidase, pour des faibles taux d'IgE spécifiques / IgE totales.

Par ajout dosé d'IgE non spécifiques de l'arachide dans le sérum n° 263 contenant à l'origine un taux élevé d'IgE spécifiques, nous observons le même type de courbe que pour des sérums individuels (figure 34, A et figure 32). Pour un taux d'IgE spécifiques de l'arachide supérieur à 20%, un plateau est atteint. Ce plateau est observé pour des taux d'IgE spécifiques allant de 10 à 20% pour les différents allergènes purifiés de l'arachide (figure 32). Le pontage de 10 à 20% des IgE fixées sur les Fc ϵ RI est donc suffisant pour induire une dégranulation maximale des mastocytes. Ces valeurs sont en accord avec celle de

MacGlashan et coll. qui ont démontré que la dégranulation de basophiles humains est maximale lorsque 10 à 15% des sites de liaison à l'antigène sont occupés [380].

Afin de distinguer le seuil de positivité de la dégranulation en fonction du pourcentage d'IgE spécifiques de l'EPBA *vs* IgE totales, les résultats des dégranulations obtenues ont été exprimés par rapport au contenu total en β -hexosaminidase après soustraction de la dégranulation basale (figure 34, B). Cela nous permet de constater à partir de quel pourcentage en IgE spécifiques la dégranulation est significative (supérieure à 5% du total). On observe que ce seuil de positivité est atteint pour un pourcentage d'IgE spécifiques *vs* IgE totales de 2%.

Ainsi, dans notre modèle cellulaire les dégranulations spécifiques induites par les allergènes de l'arachide sont corrélées au pourcentage IgE spécifiques *vs* IgE totales des sérums. A partir de 10 à 20% d'IgE spécifiques, les dégranulations sont maximales tandis que des dégranulations significatives ne sont obtenues que pour des sérums ayant plus de 2% d'IgE spécifiques *vs* IgE totales. Notons que ces résultats sont différents de ce qui a été observé pour le lait. Aucune corrélation entre les taux d'IgE spécifiques des allergènes du lait et l'intensité de la dégranulation n'a pu être mise en évidence, tandis qu'une dégranulation spécifique a été observée pour des sérums présentant moins de 0,1% d'IgE spécifiques.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Dibbern et coll. qui ont montré que l'activité des sérums sensibilisés à l'arachide est corrélée avec le pourcentage d'IgE spécifiques de l'arachide *vs* IgE totales dans un test de dégranulation des mastocytes utilisant la lignée cellulaire RBL SX-38 (coefficient de corrélation de Spearman = 0,62, $p=0,01$) [352]. Cependant, dans cette étude, les dégranulations étaient encore mieux corrélées aux concentrations en IgE spécifiques dans les sérums (coefficient de corrélation de Spearman = 0,95, $p<0,001$), ce que nous n'avons pas observé. Les auteurs ayant utilisé les sérums à dilution constante, il apparaît logique que la dégranulation soit mieux corrélée à la teneur en IgE spécifiques dans le sérum tandis que l'utilisation des IgE à une concentration définie « biaise » cette corrélation. Il est intéressant de noter que les dégranulations obtenues par Dibbern et coll. atteignaient un plateau pour des sérums dont la concentration en IgE spécifiques de l'arachide était supérieure à 30 UI/mL et pour des taux d'IgE spécifiques supérieurs à 10%. Dans notre modèle, le plateau est atteint pour des sérums dont les taux d'IgE spécifiques sont de 10 à 20%. De leur côté, Marchand et coll., en utilisant un modèle avec des cellules transfectées uniquement par la chaîne α du Fc ϵ RI, n'ont montré aucune

corrélation entre le contenu en IgE spécifiques et le potentiel de dégranulation des sérums [346]. Une très bonne corrélation linéaire entre le pourcentage d'IgE spécifiques et la dégranulation était pourtant obtenue dans cette étude à l'aide d'IgE humaines monoclonales purifiées.

Malgré une grande variation dans les intensités de dégranulation dans la population d'étude, le pourcentage d'IgE spécifiques dans les sérums est un bon indicateur de la capacité d'un sérum à sensibiliser les cellules RBL SX-38 et à induire une dégranulation spécifique d'un allergène.

III.2.2.2.b. Existe-t-il un lien entre la capacité des sérums à dégranuler les cellules et la symptomatologie du patient ?

La capacité d'un sérum à induire la dégranulation des cellules pourrait être éventuellement corrélée à la symptomatologie du patient correspondant. Nous avons donc séparé les résultats de dégranulation *in vitro* en fonction de la sévérité des symptômes constatés après ingestion d'arachide par les patients dont les sérums ont été utilisés. Parmi ces patients, 4 ont des symptômes cliniques légers à modérés tandis que les 8 autres ont des symptômes cliniques sévères.

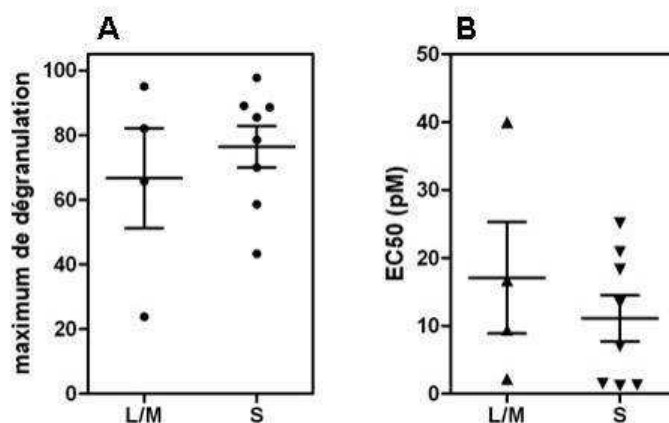


Figure 35 : Paramètres des courbes de dégranulation obtenues pour l'EPBA (A : maximum de dégranulation, et B : EC50) selon la symptomatologie des patients. (L/M : léger à modéré (n=4), S : sévère (n=8))

Concernant les sérums des patients impliqués dans notre étude et malgré quelques tendances, ni les MaxD, ni les EC50 obtenus avec l'EPBA ne sont significativement corrélés à la sévérité des manifestations cliniques de l'allergie à l'arachide (figure 35). On observe en effet, dans les deux groupes de patients, des sérums pour lesquels les intensités de

dégranulation (MaxD) sont parmi les plus faibles et les plus fortes. De la même façon, des patients ayant une allergie légère à modérée présentent des valeurs d'EC50 parmi les plus faibles tandis que des patients ayant une symptomatologie sévère sont caractérisés par des valeurs d'EC50 parmi les plus fortes. Les mêmes résultats ont été observés pour les différents allergènes purifiés de l'arachide (non montré).

Cependant, la population de sérums que nous avons sélectionnée pour cette étude n'est pas représentative de la population générale de patients allergiques à l'arachide. En premier lieu, les sérums sélectionnés sont majoritairement des sérums de patients ayant des symptômes sévères (8/12). De plus, du fait de la nécessité d'une quantité optimale d'IgE de 1 UI par puits pour la réalisation du test cellulaire, les sérums de patients ayant des symptômes légers à modérés ont été sélectionnés pour avoir des concentrations en IgE spécifiques de l'arachide élevées. Or, dans le cas de l'allergie à l'arachide, la sévérité des symptômes est directement corrélée aux concentrations en IgE spécifiques de l'arachide dans les sérums [228;381]. La population de patients présentant des symptômes légers à modérés dans notre étude n'est donc pas représentative de la population globale de ces patients. Cependant, si on considère effectivement que les sérums ayant des taux très forts en IgE spécifiques sont issus de patients ayant une symptomatologie sévère, indirectement, les résultats obtenus dans ce test cellulaire de déclenchement de la réaction allergique sont corrélés avec la symptomatologie des patients. Nous avons en effet démontré dans cette étude que les intensités des dégranulations sont positivement corrélées avec les taux d'IgE spécifiques des allergènes vs IgE totales dans les sérums.

III.2.2.2.c. Les complexes IgE-IgG présents dans les sérums ont-ils une influence sur le test de dégranulation ?

Les tests de déplétion des sérums en IgG nous ont conduits à la perte quasiment complète des IgE dans les fractions passées sur protéine G, suggérant que les IgE restaient fixées sur la matrice. L'absence d'affinité de cette matrice pour les IgE nous laissait suspecter l'existence d'un anticorps intermédiaire fixant les IgE et se liant à la protéine G. La présence dans les sérums d'anticorps IgG spécifiques des IgE a été maintes fois décrite dans la littérature. Nous nous sommes donc interrogés sur l'existence d'IgG anti-IgE et leurs conséquences sur la capacité des sérums à induire une dégranulation. Nous avons donc mis au point des outils de dosage de ces complexes dans les sérums humains, en adaptant les dosages

des IgE et des IgG totales réalisés couramment au laboratoire. Le principe de ce nouveau dosage est de capturer les IgE sériques sur des plaques revêtues par un anticorps anti-IgE humaines, puis de révéler la présence d'IgG complexées aux IgE à l'aide d'un traceur anti-IgG humaines. Nous avons utilisé des traceurs anti-IgG humaines spécifiques des 4 différentes sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4). Les anticorps utilisés ne reconnaissent que les isotypes contre lesquels ils sont dirigés. Afin de pouvoir comparer les taux de complexation entre les différents sérums, nous avons incubé les sérums à des concentrations fixes en IgE (5, 1 ou 0,2 UI/mL) estimées par dosage des IgE totales.

Les complexes IgE-IgG ont été dosés dans les 12 sérums de patients allergiques à l'arachide impliqués dans notre étude de dégranulation. Le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide et le pool de sérums de patients allergiques au lait ont également été analysés. Dans un premier temps, nous avons dosé les complexes IgE-IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 avec les sérums non prétraités (c'est-à-dire non immunopurifiés en IgE). Les résultats sont présentés séparément, figure 36 pour les complexes IgE-IgG1, IgG2 et IgG3 et figure 37 pour les complexes IgE-IgG4.

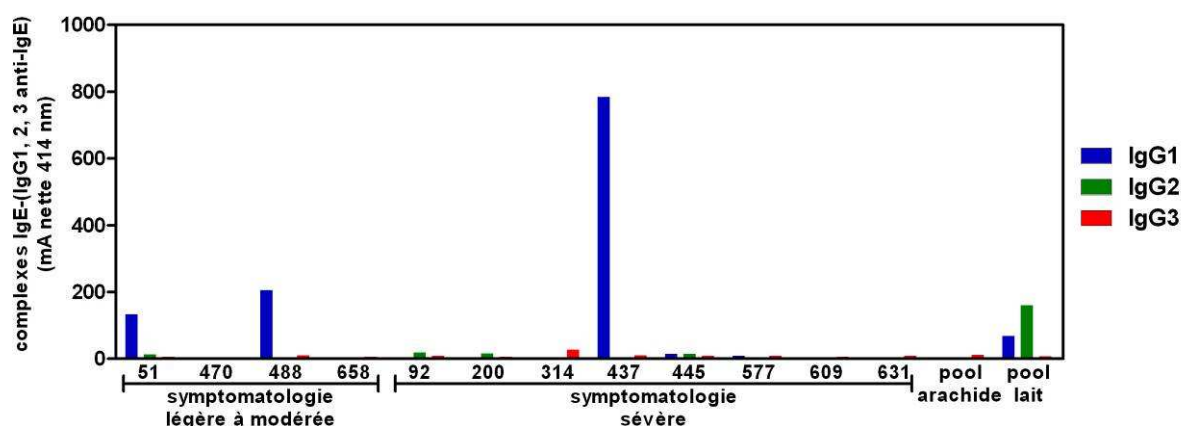


Figure 36 : Dosage des complexes IgE-IgG1, 2 et 3 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide.

Après incubation sur plaque anti-IgE des sérums (à 5 UI/mL d'IgE totales), les complexes IgE-IgG1, 2 ou 3 sont révélés par des traceurs anti-IgG1, 2, ou 3.

Comme nous pouvons le constater (figure 36), pour une concentration en IgE de 5 UI/mL, seuls 3 sérums montrent des signaux significatifs traduisant la présence de complexes IgE-IgG1. De façon surprenante, seul le pool de sérums de patients allergiques au lait montre un signal révélant la présence de complexes des IgE par des IgG2 anti-IgE. A l'inverse, les dosages démontrent l'absence de complexes IgE-IgG3 quel que soit le sérum considéré.

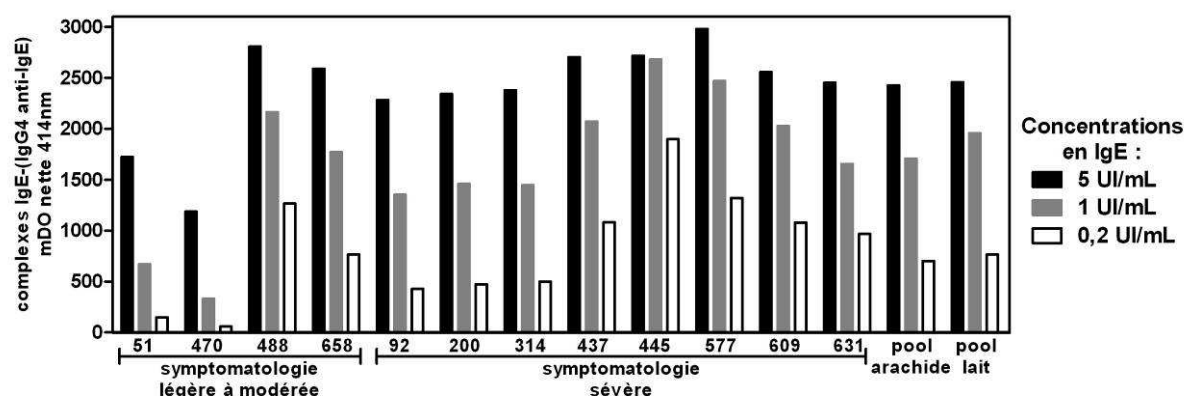


Figure 37 : Dosage des complexes IgE-IgG4 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide.

Après incubation sur plaque anti-IgE des sérums (à 5, 1 ou 0,2 UI/mL d'IgE totales), les complexes IgE-IgG4 sont révélés par des traceurs anti-IgG4.

Par contre, tous les sérums présentent des complexes formés avec des IgG4 anti-IgE (figure 37). Les signaux observés sont proches de la saturation à 5 UI/mL d'IgE, puis diminuent proportionnellement avec la baisse des concentrations en IgE, démontrant que le signal dépend bien de la quantité des IgE déposées. Du fait de la spécificité de nos différents anticorps secondaires, ces résultats suggèrent que nous avons bien des IgE fixées par la phase solide et des IgG4 liées à ce support et révélées par le traceur. Nous pouvons observer une grande hétérogénéité des quantités d'IgG4 complexées aux IgE pour les différents sérums. Par exemple, le signal mesuré pour le sérum 470 dilué à 5 UI/mL d'IgE est équivalent à celui obtenu pour le sérum 488 dilué à 0,2 UI/mL d'IgE. Par extrapolation, on peut donc considérer que les IgE du sérum 470 sont 25 fois moins complexées que celles du sérum 488.

Ces premiers résultats suggèrent donc que, dans les sérums humains de patients allergiques, des complexes IgE-IgG sont présents et que ces complexes sont formés majoritairement par des IgG4. Les complexes IgE-IgG4 ont donc par la suite été dosés après immunopurification des IgE des sérums correspondant au traitement préalable à la sensibilisation des cellules RBL SX-38. Les résultats sont donnés figure 38.

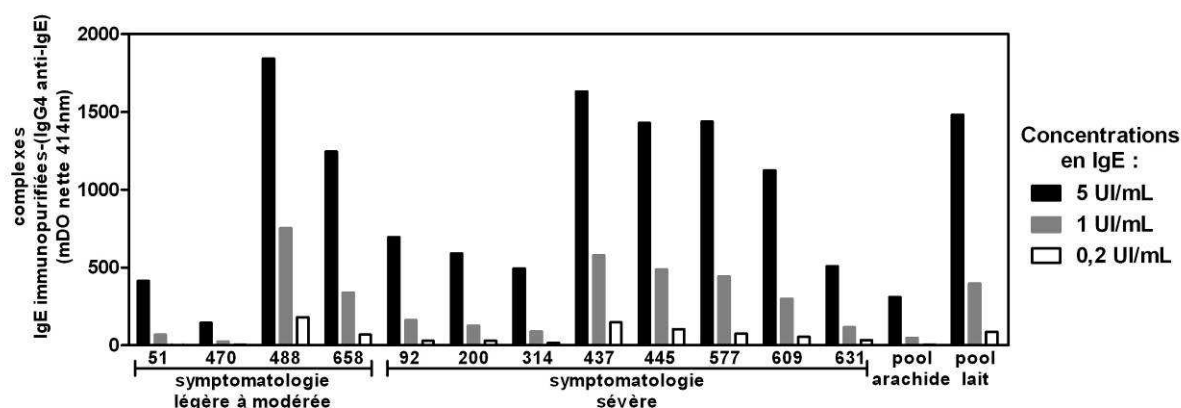


Figure 38 : Dosage des complexes IgE-IgG4 dans les sérums de patients allergiques à l'arachide après immunopurification des IgE.

Après incubation sur plaque anti-IgE des sérums (à 5, 1 ou 0,2 UI/mL d'IgE totales), les complexes IgE-IgG4 sont révélés par des traceurs anti-IgG4.

Après immunopurification des IgE, des signaux sont également observés pour tous les sérums testés, les quantités de complexes étant hétérogènes d'un sérum à l'autre. On note néanmoins des signaux beaucoup plus faibles que précédemment, bien que les quantités d'IgE soient les mêmes, suggérant que les IgE sont moins complexées après immunopurification. Cette perte n'est pas du même ordre d'un sérum à l'autre. Par exemple, pour le sérum 51, un signal de l'ordre de 400 mA est obtenu pour une concentration d'IgE immunopurifiées de 5 UI/mL alors que le même signal était observé pour une concentration en IgE non traitées située entre 0,2 et 1 UI/mL (figure 37). La diminution du signal est encore plus importante pour le pool de sérums de patients allergiques à l'arachide après immunopurification. On retrouve malgré tout la différence d'un facteur 25 entre les quantités de complexation des IgE immunopurifiées du sérum 470 et du sérum 488.

Il est concevable que la complexation IgE-IgG4 puisse empêcher la liaison des IgE aux anticorps anti-IgE couplés au sépharose, entraînant donc un appauvrissement en complexes IgE-IgG4 lors de l'immunopurification. Cependant, les anticorps monoclonaux anti-IgE utilisés pour l'immunopurification sont identiques à ceux intervenants dans le dosage des IgE. S'il y avait une telle absence de fixation, cette fraction de complexe ne serait donc pas détectée, dès l'origine dans le sérum non immunopurifié. Une autre hypothèse serait que certaines IgE pourraient être décomplexées lors de l'immunopurification. Nous avons pu constater dans des expériences complémentaires que le passage sur protéine G des sérums après immunopurification des IgE entraînait des pertes en IgE du même ordre de grandeur que celle constatée pour les sérums non prétraités, c'est-à-dire 95%. Cette simple expérience

démontre donc que les IgE immunopurifiées restent complexées après immunopurification. Une autre hypothèse serait que plusieurs IgG4 sont liées à une IgE. Lors de l'étape d'immunopurification, impliquant un choc acide, une partie de ces IgG4 pourrait en fait être décomplexée mais les IgE resteraient liées par d'autres IgG4.

A partir des résultats obtenus avec les IgE totales, nous avons cherché à vérifier l'état de complexation des IgE spécifiques de l'arachide. Pour cela, des IgE immunopurifiées ont été incubées sur des plaques revêtues par de l'EPBA à des concentrations en IgE spécifiques de l'EPBA de 5, 1 et 0,2 UI/mL. Les IgE ont été préalablement immunopurifiées afin ne pas avoir d'IgG spécifiques de l'arachide dans les sérums. Les IgG4 complexées aux IgE fixées spécifiquement à l'EPBA sont par la suite révélées par le traceur anti-IgG4 couplé à la G4. Les complexations obtenues ont été comparables à celles observées avec les IgE totales immunopurifiées tant en termes de quantité que d'hétérogénéité d'un sérum à l'autre (non montré). Ces résultats sont donc en accord avec ceux de Magnusson et coll. qui ont montré que les IgG4 anti-IgE lient la partie Fc des IgE [382].

L'interaction possible entre IgE et IgG pourrait influencer la fixation des IgE sur leurs récepteurs et particulièrement sur celui de haute affinité, le FcεRI. Ces complexes pourraient par exemple bloquer la liaison des IgE au FcεRI si les IgG ont des sites de fixation identiques ou proches de ceux des récepteurs. Au contraire, ils pourraient potentialiser cette liaison après modification structurale des IgE. En effet, Nawata et coll. avaient montré la présence d'IgG anti-IgE dans les sérums, conduisant à la formation de complexes immuns avec les IgE. Il semble que la présence de ces complexes est plus fréquente chez des patients ayant un asthme atopique (95%) ou une dermatite atopique (87%) comparés à des patients ayant un asthme non atopique (72%) [383;384]. Iwamoto et coll. ont également décrit un taux plus élevé de complexes IgE-IgG chez des patients ayant un asthme atopique sévère [385]. De plus, Jarzab et Gawlik ont mis en évidence des quantités de complexes IgE-IgG plus importantes durant la saison pollinique chez des patients ayant une allergie respiratoire [386]. Les sous-classes d'IgG impliquées dans ces complexes sont décrits, pour des patients atopiques, comme étant des IgG1 et des IgG4 par Carini et coll. [387]. Nos résultats montrent également que les complexes impliquent principalement des IgG4 et, pour quelques sérums, des IgG1. Notons que dans une autre étude, ce sont les IgG1 et des IgG3 qui étaient impliqués [388], ce que nous n'observons pas dans le cadre de la sensibilisation à l'arachide. Ces études suggèrent que ces complexes ont un rôle non négligeable dans la réaction allergique. Nous avons donc vérifié si les taux de complexations étaient différents selon la symptomatologie des patients

dont les sérums ont été utilisés dans cette étude, et si les différents paramètres des dégranulations obtenus dans le test de déclenchement de la réaction allergique étaient corrélés à ces taux de complexation des IgE par les IgG4 anti-IgE.

Dans un premier temps, si l'on compare les patients ayant une symptomatologie légère à modérée (n=4) et ceux ayant une symptomatologie sévère (n=8), nous n'observons pas de différence (figure 37). La complexation des IgE par les IgG4 anti-IgE n'explique pas non plus les résultats des dégranulations obtenues pour l'EPBA, tant pour les intensités des dégranulations que pour les EC50 obtenues (figure 39).

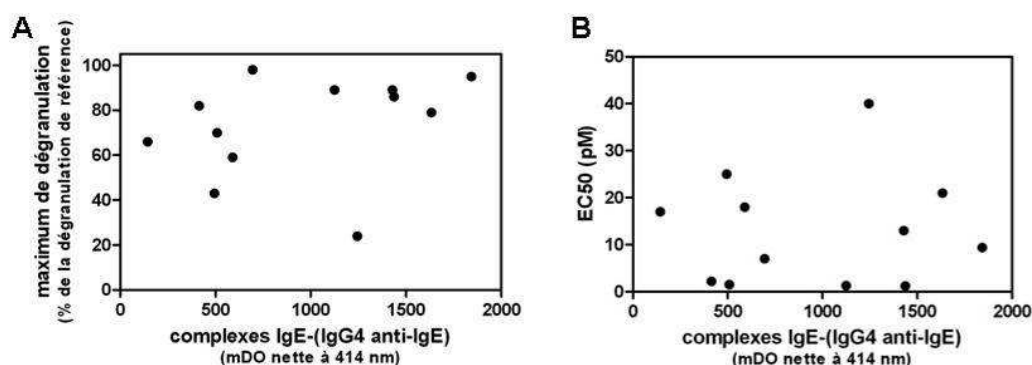


Figure 39 : Paramètres des courbes de dégranulation obtenues pour l'EPBA (A : maximum de dégranulation, et B : EC50) selon les taux de complexes IgE-(IgG4 anti-IgE) dans les sérums.

Nous avons mis en évidence des niveaux de complexation des IgE par des IgG4 anti-IgE variables d'un sérum à l'autre. Pour les 12 sérums de notre étude, les quantités d'IgG4 anti-IgE complexées aux IgE ne sont pas corrélées à la sévérité des symptômes des patients et ne sont pas non plus liées à la capacité des sérums à induire la dégranulation des cellules dans notre modèle. Lichtenstein et coll. ont montré que des dégranulations de basophiles pouvaient être induites par des anticorps anti-IgG, ces anticorps se liant aux IgG impliquées dans les complexes IgE-IgG fixés via les IgE aux FcεRI exprimés à la surface des basophiles [389]. Lors de l'utilisation des sérums sans pré-traitement pour sensibiliser les cellules, ce phénomène se produit peut-être, ce qui expliquerait en partie les différences observées pour des sérums utilisés sans prétraitement. D'autre part, ces complexes IgE-IgG pourraient lier des récepteurs FcγRII à la surface des cellules effectrices, ce qui inhiberait l'activation des mastocytes et basophiles par les allergènes [390]. Notre modèle cellulaire n'exprime que le FcγRII humain, par conséquent, nous ne pouvons voir ce type d'interactions avec les autres récepteurs présents sur les mastocytes et basophiles.

Des études intéressantes sur ces complexes seraient de comparer la présence de complexes chez différentes populations, notamment des individus non allergiques (tolérants) et des patients allergiques à l'arachide ou au lait de vache. Un suivi longitudinal de patients allergiques pourrait également être une bonne source d'information. De plus, afin de compléter l'étude sur un éventuel effet des complexes dans ce modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique, il faudrait comparer la capacité de sensibilisation des cellules, via les dégranulations induites par les allergènes, à partir des IgE d'un même sérum libres ou complexées aux IgG4. Nous avons testé plusieurs approches pour séparer les IgE des IgG4 anti-IgE comme le chauffage à 56°C [391], des traitements à pH acides ou basiques, ou par dissociation par le thiocyanate. Cependant, nous n'avons pas pu rompre cette liaison par ces techniques, et obtenir des IgE libres, suggérant une très forte affinité des IgG4 impliquées. Différentes approches envisagées au laboratoire devraient permettre de décomplexer les IgE, en prenant garde à ne pas les dénaturer et à ne pas endommager leur paratope. Cela est nécessaire pour poursuivre ces études et comprendre le rôle des complexes dans nos modèles.

III.2.2.3. Conclusions

Nous avons obtenu des dégranulations significatives pour tous les allergènes de l'arachide testés, confirmant ainsi leur fonctionnalité. Les intensités de dégranulation sont corrélées aux taux d'IgE spécifiques des différents allergènes vs IgE totales contenues dans les sérums. Nous avons montré que le pontage de 10 à 20% des IgE fixées sur les FcεRI est suffisant pour induire une dégranulation maximale des mastocytes, ces valeurs étant en accord avec les données publiées [380]. De plus, pour les allergènes de l'arachide, des sérums ayant plus de 2% d'IgE spécifiques vs IgE totales suffisent à sensibiliser les cellules en vue d'une dégranulation.

La comparaison des EC50 obtenues a permis de mettre en évidence le fort potentiel de dégranulation des albumines 2S de l'arachide, Ara h 2 et Ara h 6. Les médianes des EC50 obtenues pour les 12 sérums sont en effet de 2,1 et 2,7 pM respectivement pour Ara h 2 et Ara h 6, alors que pour l'EPBA, Ara h 3, Ara h 1 et le fragment de Ara h 3, les médianes sont respectivement de 11, 65, 150 et 290 pM. Ces données sont en accord avec des études qui soulignent la forte allergénicité des albumines 2S par différents tests *in vitro* comme *in vivo*.

Cette implication dans l'allergénicité de l'arachide est d'autant plus forte que les quantités de Ara h 3 ou Ara h 1 sont importantes pour induire une dégranulation [163;173;174;184;371;378]. Un des intérêts de notre étude est que nous avons comparé les principaux allergènes de l'arachide en même temps et pour les mêmes sérums. Ces résultats corroborent des études comparant l'activité biologique des allergènes d'arachide par tests cutanés qui ont montré que Ara h 2 et Ara h 6 sont les allergènes de l'arachide induisant les réactions les plus fortes [163;173;174].

Nous avons également cherché à voir s'il existait des corrélations entre les intensités de dégranulations observées, ou les valeurs d'EC50 obtenues pour l'EPBA et les différents allergènes de l'arachide, et la symptomatologie des patients. Nous n'avons pas observé de lien particulier. Des sérums de patients ayant une symptomatologie sévère peuvent en effet induire des dégranulations de faible intensité avec des EC50 élevées. A l'inverse des sérums de patients ayant une allergie légère à modérée peuvent induire des dégranulations d'une intensité élevée avec des valeurs d'EC50 parmi les plus faibles obtenues. La sévérité de la réaction allergique ne s'explique pas par le seul fait d'induire facilement et fortement la dégranulation des mastocytes *in vivo*. De nombreux autres facteurs peuvent entrer en jeu. Dans cette optique, nous nous sommes demandés si la complexation des IgE par les IgG anti-IgE présentes dans les sérums pouvait avoir une influence sur leur capacité à sensibiliser les cellules et/ou à moduler la dégranulation ultérieure dans ce test cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Nous avons mis au point un système pour doser les complexes IgE-IgG présents dans les sérums et nous avons montré que ces complexes impliquent principalement des IgG4 qui ne sont pas spécifiques de la partie variable de l'IgE puisque les IgE spécifiques sont tout autant complexées que les IgE totales. Pour notre population de sérums, des niveaux de complexation différents ont été mis en évidence, avec des différences pouvant aller jusqu'à un facteur 25. Les niveaux de complexation des IgE des sérums de patients allergiques à l'arachide ne sont cependant pas corrélés à la symptomatologie des patients, ni aux différents paramètres des dégranulations obtenues (intensité et dose d'allergène nécessaire pour induire la dégranulation).

Les valeurs d'EC50 obtenues pourraient être le reflet d'affinités différentes des IgE spécifiques. L'affinité des IgE pour les allergènes est peu étudiée. Hantusch et coll. ont étudié les cinétiques d'association et de dissociation de la liaison des IgE et des IgG aux allergènes Phl p 5 (pollen de graminée) et Bet v 1a (pollen de bouleau) par résonance plasmonique de

surface. Ils ont montré que les affinités des IgE sont comprises entre 10^{-10} et 10^{-11} M et celles des IgG entre 10^{-7} et 10^{-8} M [392]. El-Khouly et coll. ont étudié l'avidité des IgE spécifiques de l'EPBA ou de Ara h 2 purifiée chez des patients allergiques à l'arachide en utilisant une méthode reposant sur la dissociation de la liaison des IgE aux allergènes par du thiocyanate dans un test ELISA. L'avidité des IgE pour Ara h 2 s'est avérée être corrélée à la sévérité de la réaction allergique évaluée par DBPCFC [393]. Récemment, Christensen et coll. ont étudié l'effet de l'affinité des IgE pour les allergènes sur leur capacité à induire la dégranulation de basophiles. Pour cela, ils ont produit des IgE recombinantes spécifiques de Der p 2, l'allergène majeur de la poussière de maison. Ils ont caractérisé l'affinité de la liaison de ces rIgE pour Der p 2 par résonance plasmonique de surface et les ont utilisées pour sensibiliser des basophiles humains. Ils ont ensuite activé les cellules avec des gammes de concentrations de Der p 2. Ces expériences montrent qu'une différence d'affinité d'un facteur 2 peut conduire à des différences de quantité d'allergènes nécessaires à la dégranulation de basophiles d'un facteur 500 à 1000 [394]. Ces études montrent l'importance de l'affinité des IgE pour les allergènes sur leur capacité à induire la dégranulation de cellules effectrices et leur lien avec la sévérité de la réaction allergique. Il serait intéressant d'analyser si, dans notre modèle cellulaire, les différences d'EC50 observées pour les différents sérums et allergènes pourraient être liées à des différences d'affinité des IgE pour les allergènes. L'affinité des IgE pour les allergènes pourrait être un marqueur de la sévérité de la réaction allergique qu'il serait intéressant d'étudier.

IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALE

- **Développement d'un test de déclenchement de la réaction allergique appliqué à l'étude de la fonctionnalité des allergènes**

Le modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique a été développé dans le but d'étudier la fonctionnalité de l'interaction entre les IgE et les allergènes et non dans celui d'obtenir un test de diagnostic. Les tests cellulaires utilisés à des fins de diagnostic reposent sur l'utilisation de basophiles issus des patients allergiques. Pour le diagnostic des allergies alimentaires, ce type de test montre une sensibilité et une spécificité variables suivant les allergènes et les types de médiateurs ou de marqueurs mesurés. Les sensibilités varient en effet de 53 à 95% et les spécificités de 43 à 97% [242;265;395-397]. Nous avons donc choisi et optimisé les paramètres d'un test de dégranulation utilisant les cellules RBL SX-38 qui expriment les 3 sous-unités du FcεRI, afin d'obtenir des dégranulations intenses et reproductibles. En dépit des variabilités décrites précédemment, nous avons cherché à mettre en évidence, dans nos conditions expérimentales, un marqueur de la sévérité des symptômes observés chez les patients allergiques à l'arachide. Nous avons montré que les intensités de dégranulation suite à l'activation par les allergènes de l'arachide sont corrélées avec les taux d'IgE spécifiques correspondantes contenues dans les sérums, mais ne sont pas directement corrélées avec la symptomatologie des patients. Les doses d'allergènes induisant la dégranulation des cellules ne sont pas non plus corrélées avec la symptomatologie des patients. Cependant notre sélection de patients, pour des raisons de disponibilité et de concentrations en IgE totales, n'est pas représentative des patients présentant des symptômes légers à modérés. Quoiqu'il en soit, la symptomatologie ne peut pas être réduite à la capacité des IgE à se fixer sur les FcεRI et à être pontées par la liaison des allergènes et ainsi induire la dégranulation des cellules effectrices.

Dans notre test, seul le pontage des IgE immunopurifiées fixées aux FcεRI humains exprimés à la surface des cellules par les différents allergènes est considéré. Or, l'expression des récepteurs est variable d'un sujet à l'autre, tout comme le nombre de cellules effectrices circulantes et présentes dans les muqueuses. Il existe de plus un polymorphisme des gènes codant pour le FcεRI. D'autre part, d'autres récepteurs peuvent moduler le processus de déclenchement de la réaction allergique, tels que le FcγRII. De plus, nous avons écarté tous les facteurs pouvant interférer dans la liaison des IgE aux récepteurs ou dans la

reconnaissance des IgE par les allergènes en utilisant des IgE immunopurifiées. Nous avons aussi utilisé les IgE à la même concentration pour tous les sérums, alors que les concentrations en IgE sont variables d'un sujet à l'autre. Pour finir, le test étant réalisé *in vitro*, il est isolé de l'environnement cytokinique et cellulaire qui peut engendrer des modulations de l'intensité de la réaction allergique.

Notre test cellulaire ne permet pas en l'état de mettre en évidence la sévérité des symptômes des patients allergiques. Cependant, il permet de discriminer le potentiel de dégranulation des allergènes. Nous avons montré la fonctionnalité des extraits allergéniques et des allergènes purifiés de deux sources allergéniques majeures, responsables de nombreux cas d'allergies alimentaires notamment chez l'enfant : le lait et l'arachide. Ces protéines sont capables d'induire *in vitro* des dégranulations spécifiques.

- **Comparaison du potentiel de dégranulation des allergènes purifiés issus d'un même aliment**

Nous avons comparé le potentiel de dégranulation des différents allergènes purifiés du lait et de l'arachide, c'est-à-dire leur capacité à induire la dégranulation des cellules RBL SX-38. Pour ces allergènes, nous avons observé une grande dispersion dans les intensités des dégranulations et dans les doses d'allergènes nécessaires pour les induire.

Les intensités de dégranulation induites par les principaux allergènes de l'arachide sont corrélées avec les taux d'IgE spécifiques vs IgE totales contenues dans les sérums. Pour ces allergènes, une dégranulation significative est obtenue pour des sérums dont la concentration en IgE spécifiques représente 2% des IgE totales et la dégranulation est maximale pour des sérums contenant 10 à 20% d'IgE spécifiques. Pour les allergènes de l'arachide, les dégranulations les plus fortes atteignent pratiquement 100% de la dégranulation de référence obtenue avec l'anticorps anti-IgE humaines. A l'inverse, nous avons observé que les intensités de dégranulation induites par les allergènes des laits de vache et de chèvre ne sont pas corrélées aux niveaux d'IgE spécifiques dans les sérums. De façon générale, les intensités de dégranulation obtenues pour les allergènes des laits de vache et de chèvre ont été plus faibles que celles obtenues dans l'étude des allergènes de l'arachide.

Les EC50 obtenues pour les allergènes de l'arachide ou des laits de vache et de chèvre sont très variables. Pour les allergènes de l'arachide, les valeurs obtenues ont toutefois montré que les albumines 2S, Ara h 2 et Ara h 6, induisaient systématiquement des dégranulations à des doses beaucoup plus faibles que Ara h 1 et Ara h 3. Ces observations confortent

l'importance de ces petites protéines très structurées dans l'allergénicité de l'arachide. La comparaison des dégranulations entre patients montre que, pour un même allergène de l'arachide, les valeurs d'EC50 obtenues sont globalement homogènes. Pour chaque allergène testé, les EC50 varient au maximum d'un facteur 30 entre sérums.

Par contre, pour les allergènes du lait, la dispersion des EC50 est beaucoup plus importante. Les valeurs peuvent varier de plus d'un facteur 1000 entre sérums pour un même allergène. Les écarts apparaissent également très forts et variables entre allergènes pour un même sérum. Ainsi, l'allergène présentant le meilleur potentiel de dégranulation (MaxD ou EC50) n'est pas le même d'un patient à l'autre. Cependant, malgré cette diversité, l'analyse des allergènes du lait souligne le potentiel de dégranulation important des fractions caséines purifiées.

De tels résultats soulignent une certaine homogénéité dans la réponse des IgE des patients allergiques à l'arachide envers ces différents allergènes. A l'inverse, elle confirme l'hétérogénéité de la réponse IgE des patients allergiques au lait envers ces différents allergènes.

La comparaison des dégranulations entre les sources allergéniques montre des valeurs d'EC50 généralement beaucoup plus faibles pour les allergènes de l'arachide que pour ceux des laits de vache et de chèvre. Pour le lait de vache, les EC50 les plus faibles sont de 7 et 8 fM pour la fraction caséine entière et la caséine β respectivement, mais ces valeurs ne sont obtenues que pour un seul sérum. La valeur la plus élevée est de 1,1 μ M pour la caséine α 2 bovine. Pour les protéines du lait de chèvre, la plus petite valeur d'EC50 est de 0,7 pM pour la caséine α 1 et la plus élevée de 5,8 μ M pour la β LG. Pour les allergènes de l'arachide, les valeurs d'EC50 obtenues ont été beaucoup plus faibles, s'échelonnant entre 0,7 pM (obtenue pour Ara h 2) et 3,1 nM (obtenue pour le fragment de Ara h 3). Pour des sérums fortement sensibilisés aux protéines d'arachide, des dégranulations spécifiques sont obtenues pour des concentrations de 120 pg/mL de l'extrait protéique total de l'arachide et même de 10 pg/mL pour les albumines 2S. Ce test fortement sensible pourrait donc être utilisé afin de détecter la présence d'arachide (mais pas de lait) dans des aliments complexes.

L'étude du potentiel allergénique des allergènes purifiés issus d'un même aliment permet de classer l'implication des protéines dans la réaction allergique. Pour le lait, nous avons montré l'importance des caséines par rapport à la β LG et pour l'arachide des albumines 2S par rapport aux autres allergènes Ara h 1 et Ara h 3 (Publication soumise, Annexe II). Des études similaires avaient été réalisées pour les allergènes de l'arachide, sans que tous ces

allergènes n'aient été testés ensemble, pour des mêmes sérums dans le même test. De plus, le potentiel de dégranulation des différents allergènes corrobore des données cliniques obtenues par tests cutanés. Pour l'étude des allergènes des laits de vache et de chèvre, ces résultats constituent, à notre connaissance, les premières données dans ce type de modèle.

- **Application du modèle à l'étude de l'effet de traitements variés sur l'allergénicité d'une protéine**

Ce modèle a également été utilisé pour étudier les différences de réactivité des allergènes après différents traitements. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de cette thèse, la digestion, les traitements thermiques et d'autres procédés industriels peuvent avoir un impact sur l'allergénicité des protéines (paragraphe II.2). Les modèles cellulaires de dégranulation constituent un outil adapté pour évaluer ces modulations de l'allergénicité des protéines. Bohle et coll. ont montré que la cuisson d'allergènes homologues de Bet v 1 provoque une perte de leur capacité à lier les IgE et à induire la dégranulation de basophiles [307]. L'effet de la digestion sur l'allergénicité du colin a également été évalué dans un test de dégranulation de basophiles humains. Après digestion, les extraits protéiques ont montré une plus faible capacité de liaison aux IgE et le test cellulaire a mis en évidence un potentiel allergénique réduit d'un facteur 10000 [284].

Nous avons donc appliqué notre modèle à l'étude de l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de la globuline 7S de l'arachide, Ara h 1. L'étude de la modulation de l'allergénicité de la protéine suite au chauffage a été évaluée en parallèle et de façon complémentaire par des tests de capacité de liaison aux IgE et dans un modèle animal de déclenchement de la réaction allergique. Les résultats obtenus sont présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

I. INTRODUCTION

Cette seconde partie de la thèse s'intéresse aux effets des traitements thermiques sur l'allergénicité de la globuline 7S de l'arachide (Ara h 1). Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme EuroPrevall. Il s'agit d'un projet intégré interdisciplinaire, financé par l'Union Européenne (IP6 FOOD-CT-2005-514000), intitulé "The Prevalence, Cost, and Basis of Food Allergy across Europe". Il implique plus de soixante partenaires provenant d'Europe et de quelques autres pays tels que le Ghana ou l'Inde. Il a pour buts principaux :

- d'établir la prévalence des allergies alimentaires chez les adultes et les enfants au niveau Européen,
- d'identifier les allergènes alimentaires émergents,
- d'étudier l'influence des facteurs génétiques et environnementaux sur la survenue des allergies alimentaires,
- de produire une banque d'allergènes purifiés d'aliments ou recombinants permettant *in fine* le développement de nouveaux outils de diagnostic,
- de fournir des informations sur l'effet de la matrice alimentaire et des procédés technologiques sur la modulation des propriétés allergéniques des aliments,
- d'évaluer l'impact socio-économique et le coût des allergies alimentaires et de leurs traitements.

Le laboratoire est notamment impliqué dans une série de travaux de recherche, le WP3.3.3 intitulé « Assessing the influence of food matrix, food processing and digestion on allergenicity ». Les objectifs de ces travaux sont : (i) de développer des stratégies pour évaluer l'allergénicité des aliments. Basées sur une meilleure compréhension de la relation entre la structure et l'activité d'un allergène, elles reposent en particulier sur l'approche intégrative développée au cours d'un programme Européen précédent (Allergest); (ii) d'évaluer l'effet de la composition de la matrice alimentaire, des procédés technologiques et de la digestion sur l'allergénicité des allergènes alimentaires. Cette évaluation de l'allergénicité repose à la fois sur l'étude du potentiel de sensibilisation des protéines, et de leur potentiel à déclencher une réaction allergique chez des individus sensibilisés.

Le but initial du programme était de comparer l'allergénicité de protéines appartenant à la famille des globulines 7S que l'on retrouve dans plusieurs aliments, notamment

l'arachide, la noisette, le soja et le pois. Les modèles d'étude se proposaient d'analyser les raisons pour lesquelles les protéines d'une même famille sont des allergènes majeurs dans certains aliments et pas dans d'autres. A cette fin, des études du potentiel de sensibilisation des protéines modèles ont été réalisées par un autre partenaire du programme dans un modèle animal de rat Brown Norway, travaux que nous n'aborderons pas dans cette thèse. Les travaux devant être réalisés par le laboratoire et dont j'avais la charge avaient pour but d'étudier l'effet des différents procédés (chauffage, digestion, inclusion dans une matrice alimentaire) sur la capacité de liaison des allergènes aux IgE, et sur leur potentiel de déclenchement à la fois *in vitro*, en utilisant le modèle cellulaire de dégranulation développé durant ma thèse, et *in vivo*, en utilisant un modèle de déclenchement de la réaction allergique chez la souris.

Les résultats présentés portent dans un premier temps sur l'étude de la sensibilisation aux allergènes de l'arachide, de la noisette et du soja. Sa réalisation a nécessité une population de sérums humains collectés dans le cadre d'EuroPrevall, complétée par des sérums de la sérothèque du laboratoire constituée en collaboration avec le Dr E. Paty et des sérums d'un programme Européen précédent (Allergest). Ces travaux ont démontré la faible voire la non sensibilisation des sérums de patients allergiques aux globulines 7S de noisette ou de soja. Le modèle d'étude initial a donc par la suite été remplacé par un autre : l'étude de l'effet de procédés technologiques sur la capacité de liaison aux IgE et le pouvoir déclenchant de deux familles de protéines de l'arachide, la globuline 7S (Ara h 1) et les albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6).

Ainsi, dans un second temps, et du fait du matériel fourni par nos partenaires européens, l'effet des traitements thermiques sur l'allergénicité a été évalué uniquement sur la protéine Ara h 1. La globuline 7S de l'arachide a été purifiée par l'IFR (Institute of Food Research, Norwich) à partir d'arachide crue, puis chauffée en solution en présence ou non de glucose. La réactivité de l'Ara h 1 purifiée au laboratoire à partir d'arachide grillée a également été étudiée en parallèle.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. PURIFICATIONS ET MODIFICATIONS DES ALLERGENES

Les préparations d'allergènes ont été effectuées par d'autres partenaires du programme Européen, notamment Neil Rigby de l'IFR. La globuline 7S de l'arachide (Ara h 1) a été purifiée à partir d'arachide crue. La protéine Ara h 1 native (Ara h 1 - N) a ensuite été chauffée en solution seule (Ara h 1 chauffée, Ara h 1 - C) ou en présence de glucose (Ara h 1 - CG). La protéine diluée à 4 mg/mL en tampon phosphate 32,5 mM contenant 100 mM de NaCl, avec ou sans glucose à 18 mg/mL, a été soumise au traitement thermique suivant : augmentation de la température de 23°C à 100°C en une minute, maintien à 100°C pendant 16 min, puis refroidissement avec un gradient de -10°C par minute jusqu'à la température finale de 25°C. Les échantillons ont ensuite été congelés à -20°C. A titre de comparaison avec ces différentes préparations de Ara h 1, la protéine Ara h 1 issue d'arachide grillée commerciale a été purifiée au laboratoire selon le protocole décrit précédemment (première partie, paragraphe II.1.2).

Afin d'étudier les profils de sensibilisation à la noisette, les allergènes naturels de la noisette Cor a 11 (globuline 7S) et Cor a 9 (globuline 11S) ont été purifiés à partir de noisette crue par l'IFR. Les allergènes recombinants Cor a 1.04 (homologue de Bet v 1) et Cor a 8 (nsLTP) ont été fournis par la banque d'allergènes d'EuroPrevall gérée par le Dr Karin Hoffman-Sommergruber (Medical University of Vienna, Autriche). L'IFR a également purifié les globulines 7S du soja (β -conglycinine).

II.2. DONNEES CLINIQUES DES PATIENTS ALLERGIQUES

RECRUTES ET CARACTERISATIONS IMMUNOLOGIQUES DE LEURS SERUMS

Des sérums de patients allergiques à l'arachide, à la noisette, au pois et/ou au soja ont été fournis par des partenaires cliniciens impliqués dans le programme EuroPrevall. Au total, 58 sérums ont été collectés, puis envoyés au laboratoire. Ces sérums sont codifiés selon une nomenclature consistant en un numéro, traduisant l'ordre d'arrivée des sérums, suivi d'une

lettre pour désigner la source allergénique à laquelle le patient était sensibilisé (A pour arachide, N pour noisette, P pour pois et S pour soja).

Trente-cinq sérums de patients allergiques à l'arachide, associée ou non à une allergie à la noisette, ont été fournis par Emilia Vassilopoulou (P&A Kyriakou Children's Hospital Department of Pediatrics, Athènes, Grèce). Les caractéristiques cliniques des patients donneurs sont répertoriées dans le tableau 18.

Tableau 18: Caractéristiques cliniques des patients allergiques à l'arachide et +/- à la noisette recrutés en Grèce dans le cadre du programme EuroPrevall

codification du sérum	Symptomatologie
10A	SPT +
11A	SPT +
12A	SPT +
13A/N	réaction systémique à l'arachide et SPT + à la noisette
14A/N	SPT + à l'arachide et à la noisette
15A/N	SPT + à l'arachide et OAS à la noisette
16A/N	SPT + à l'arachide et à la noisette
17A/N	OAS à l'arachide et à la noisette
18A/N	SPT + à l'arachide et OAS à la noisette
19A/N	SPT + à l'arachide et à la noisette
20A/N	SPT + à l'arachide et histoire + à la noisette
21A/N	SPT + à l'arachide et histoire + à la noisette
22A/N	histoire +
23A/N	SPT + à l'arachide et histoire + à la noisette
28A à 49A (n=21)	Non précisée

A : arachide, N : noisette, SPT : skin prick test, OAS : syndrome oral d'allergie.

D'autres sérums de patients allergiques à l'arachide ont été fournis par différents partenaires du programme EuroPrevall : 2 sérums par le Dr Barbara Ballmer-Weber (University Hospital Zurich, Suisse), 1 sérum par le Dr Laurian Zuidmeer (Department of Experimental Immunology, Academic Medical Center, Amsterdam, Pays-Bas) et 6 sérums par Yvonne Vissers (Agrotechnology and Food Innovations, Wageningen, Pays-Bas). Les caractéristiques immunologiques des sérums correspondants et les symptomatologies des patients donneurs sont répertoriés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Caractéristiques immunologiques des sérums de patients allergiques à l'arachide collectés en Suisse et aux Pays-Bas dans le cadre d'EuroPrevall, et données cliniques

Codification du sérum	Clinicien	Genre	Symptomatologie	RAST IgE totales / arachide
1A	Dr B. Ballmer-Weber		An ou DBPCFC +	
2A			An ou DBPCFC +	
52A	Dr L. Zuidmeer			
53A	Y. Vissers	f		IgE totales : 39,3 kU/L arachide : 13,95 kU/L (classe 3)
54A		f		IgE totales : 648,5 kU/L arachide : > 100 kU/L (classe 6)
55A		f		IgE totales : 973,1 kU/L arachide : > 100 kU/L (classe 6)
56A		m		IgE totales > 377,5 kU/L arachide : > 100 kU/L (classe 6)
57A		f		IgE totales > 3000 kU/L arachide : > 100 kU/L (classe 6)
58A		f		IgE totales > 3000 kU/L arachide : > 100 kU/L (classe 6)

A : arachide, An : anaphylaxie, DBPCFC : double blind, placebo-controlled food challenge, RAST : radio allergosorbent test.

Des sérums de patients allergiques à la noixette ont également été fournis par le Dr Frédéric de Blay (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France), le Dr Montserrat Fernández-Rivas (Hospital Clinico San Carlos, Madrid, Espagne) et le Dr Barbara Ballmer-Weber (University Hospital Zurich, Suisse). Les codes et caractéristiques immunologiques des sérums, ainsi que la symptomatologie des patients donneurs, sont répertoriés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Caractéristiques immunologiques des sérums de patients allergiques à la noisette collectés dans le cadre du programme EuroPrevall provenant de France, Espagne et Suisse, et données cliniques.

Codification du sérum	Clinicien	Genre	Symptomatologie	RAST IgE spécifiques à la noisette
5N	Dr F. de Blay	F	R, C, As	
6N		M	R, C, As	
7N		F	R, C	
8N		M	R, C	
9N		F	R, C, As	
25N	Dr M. Fernández Rivas	F	U, UC, SPT +	5,06 kU/L
26N		M	OAS, SPT +	2,34 kU/L
27N		F	AO, SPT +	7,31 kU/L
50N	Dr B. Ballmer-Weber			
51N				

N : noisette, SPT : skin prick test, R : Rhinite, C : Conjonctivite, As : Asthme, OAS : syndrome oral d'allergie, U : urticaire, UC : urticaire de contact, AO : angio-œdème.

Des sérums de patients allergiques au soja ou au pois ont également été fournis par le Dr Barbara Ballmer-Weber (University Hospital Zurich, Suisse) et Emilia Vassilopoulou (P&A Kyriakou Children's Hospital Department of Pediatrics, Athènes, Grèce) (tableau 21).

Tableau 21 : Caractéristiques cliniques des patients allergiques au soja ou au pois recrutés dans le cadre du programme Europrevall.

Codification du sérum	Clinicien	Symptomatologie
3S	Dr B. Ballmer-Weber	An ou DBPCFC +
4S		An ou DBPCFC +
24P	E. Vassilopoulou	SPT +

P : pois, S : soja, An : anaphylaxie, SPT : skin prick test, DBPCFC : double blind, placebo-controlled food challenge.

Une série de 12 sérums, collectés lors du programme Allergest et dont il restait des volumes importants au laboratoire, ont également été inclus à cette étude, avec l'accord du clinicien qui les avait fournis et qui est également impliqué dans Europrevall (Dr. Zsolt Szepefalusi, Department of Pediatrics and Juvenile Medicine, Medical University, Vienne, Autriche) (tableau 22).

Tableau 22 : Caractéristiques cliniques des patients recrutés dans le cadre du programme Allergest.

N° du sérum	Genre	Sérum (S) ou Plasma/PBS (v/v) (P/P)	RAST arachide (classe)	Symptômes après exposition à l'arachide
1682	m	S		AO, An
1691	m	S	5	D, OB, GI
2205	m	S	5	GI, OO, OB
2206	m	P/P	5	GI, OO, An
2207	m	S	4	
2208	m	P/P	3	GI, OO
2209	f	P/P	6	OB, An
2303	f	P/P	3	Ecz, GI, OO
2304	m	P/P	6	GI, OB
2305	f	P/P		OB, OO, Ecz, GI
2306	m	P/P	5	An, OB, OO, Ecz, GI
2308	f	P/P	4	OO, GI

AO : angio-œdème, An : anaphylaxie, D : dyspnée, OB : obstruction bronchique, GI : symptômes gastro-intestinaux, OO : œdème oral, Ecz : eczéma.

Afin de compléter notre étude, 9 sérums de patients allergiques à l'arachide provenant du Dr E. Paty (Service de Pédiatrie Allergologie Pneumologie, Hôpital Necker, Paris) ont été inclus (tableau 23), ainsi que le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide décrit dans la première partie de cette thèse (paragraphe II.2.1). Les résultats obtenus avec ces sérums ne sont pas inclus dans les différents rapports de programme Europrevall étant donné qu'ils proviennent de cliniciens non impliqués dans celui-ci.

Tableau 23 : Caractéristiques cliniques des patients de la sérothèque constituée en collaboration avec le Dr E. Paty.

N° du sérum	Genre	Age (ans)	Symptomatologie	Remarques
181	f	5		DA, TC+, TPO+12gr
407	f	5,5	LM	TPO + à 800 mg
415	m	5		
437	m	15,5	S	TPO + à 400 mg
448	f	5,5	S	crise d'asthme, TPO + à 400 mg
449	m	4		DA, TC+, TPO + à 800 mg
488	f	12	LM	Urticaire ou vomissements, TPO + à 200 mg
497	f	5	S	
505	m	10		DA, TC+, TPO + à 100mg

LM : légère à modérée, S : sévère, DA : dermatite atopique,
TC : test cutané, TPO : test de provocation orale.

II.3. ETUDE DE LA CAPACITE DE LIAISON DES ALLERGENES NATURELS/MODIFIES AUX IGE DE PATIENTS ALLERGIQUES

La détection des IgE totales et spécifiques contenues dans les sérums a été réalisée par méthodes immuno-analytiques classiques (EAST) ou selon le format de capture des IgE précédemment décrits (paragraphe II.3.4.2).

II.3.1. Dosage des IgE spécifiques humaines

II.3.1.1. Dosage des IgE spécifiques par EAST

Les IgE spécifiques des différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG et grillée), des différents allergènes de noisette (rCor a 1.04, rCor a 8, Cor a 9 et Cor a 11) et de la globuline 7S du soja ont ainsi été quantifiées sur des plaques revêtues par ces différents allergènes. Les IgE spécifiques de la fraction protéique de l'arachide (EPBA) et de différents allergènes purifiés (Ara h 2 et Ara h 6) ont également été quantifiées dans certains des sérums collectés.

II.3.1.2. Détection des IgE spécifiques par capture des IgE

La détection des IgE spécifiques des allergènes a été réalisée par capture des IgE. Dans ce format, les IgE sériques sont capturées sur une plaque revêtue par un anticorps anti-IgE humaines, puis les IgE spécifiques de Ara h 1 - N sont révélées à l'aide d'un traceur Ara h 1 - N - G4 préparé au laboratoire selon la méthode décrite précédemment (première partie, paragraphe II.3.3). Les IgE spécifiques de Ara h 1 grillée - G4 ont également été détectées selon le même protocole. Les IgE spécifiques de la fraction protéique de l'arachide (EPBA) et de différents allergènes purifiés (Ara h 2 et Ara h 6) ont également été détectés dans certains sérums selon ce format, en utilisant les traceurs enzymatiques correspondants. Ces dosages ont notamment été réalisés pour confirmer l'absence d'IgE spécifiques de l'arachide observés en EAST chez certains patients.

II.3.2. Etude de la capacité de liaison des allergènes aux IgE de patients allergiques

La capacité de liaison des allergènes aux IgE est mesurée grâce à un test d'inhibition de la liaison d'IgE spécifiques à l'allergène traceur (en capture d'IgE). Le principe de ce test reprend les conditions du test décrit précédemment pour la détermination des IgE spécifiques (II.3.1.2), avec l'introduction de compétiteurs lors du dépôt de l'allergène traceur. La composition des différents tampons est décrite dans la première partie, paragraphe II.3.1.2.

Pratiquement, les sérums sont incubés pendant 18 h à 4°C à raison de 50 µL par puits dilués en tampon EIA sur des plaques revêtues par un anticorps anti-IgE humaines (clone LE27). La dilution optimale de chaque sérum est déterminée à l'aide des résultats obtenus lors du dosage des IgE spécifiques en capture d'IgE. Après lavage, la compétition est réalisée par ajout simultané du compétiteur (25 µL/puits) et de l'allergène couplé à la G4 (25 µL par puits, à 2 UE/mL final). Les compétiteurs sont des solutions contenant des concentrations croissantes connues des différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée). Deux formats de test de compétition sont effectués et s'intéressent à la spécificité des IgE à l'arachide crue ou à l'arachide grillée. Deux traceurs sont donc utilisés : Ara h 1 - N - G4 ou Ara h 1 issue d'arachide grillée et couplée à la G4 (Ara h 1 grillée - G4). Après 4 h d'incubation à 20°C sous agitation, la plaque est lavée puis la liaison IgE-allergène traceur est

révélée en ajoutant 200 µL de réactif d'Ellman par puits. La mesure de l'absorbance à 414 nm est réalisée à différents temps. Après soustraction de la valeur témoin obtenue en l'absence de sérum, les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison « B/B0 », où B0 et B représentent respectivement le signal de liaison du traceur aux IgE en l'absence (signal maximal) ou en présence de compétiteur. Les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison des IgE au traceur (IC50) sont alors déterminées.

II.4. ETUDE *IN VITRO* DU POTENTIEL DE DECLenchement DES ALLERGENES NATURELS OU MODIFIES A L'AIDE DES IgE HUMAINES

Ces études ont été réalisées à l'aide des cellules RBL SX-38 selon les conditions optimales précédemment décrites (voir bilan tableau 10).

II.5. ETUDE *IN VIVO* ET *IN VITRO* DU POTENTIEL DE DECLenchement DES ALLERGENES NATURELS/MODIFIES CHEZ LA SOURIS BALB/C

Le principe de cette expérience consiste à immuniser des souris avec la protéine sensibilisante puis à déclencher la réaction allergique avec cette même protéine ou avec les protéines modifiées. L'efficacité de la sensibilisation est contrôlée par le dosage des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de la protéine sensibilisante, ainsi que par le dosage des cytokines sécrétées après réactivation spécifique des splénocytes. L'intensité des réponses allergiques induites par les tests de provocation est alors comparée selon les protéines déclenchantes, afin de révéler l'effet de la modification de la protéine d'intérêt sur son potentiel de déclenchement. Les marqueurs de la réaction allergique immédiate, leucotriènes et prostaglandines, sont dosés dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) collectés 10 min après un test de provocation intra-trachéal (i.t.). Les marqueurs tardifs de la réaction allergique, cytokines Th2 et influx de neutrophiles/éosinophiles, sont mesurés dans les LBA collectés 24 h après un test de provocation intra-nasal (i.n.) (Adel-Patient et coll., 2003 [261]).

L'expérience réalisée a ainsi consisté à sensibiliser les souris avec Ara h 1 - N puis à réaliser des tests de provocation avec Ara h 1 - N, - C et - CG selon le protocole schématisé figure 40.

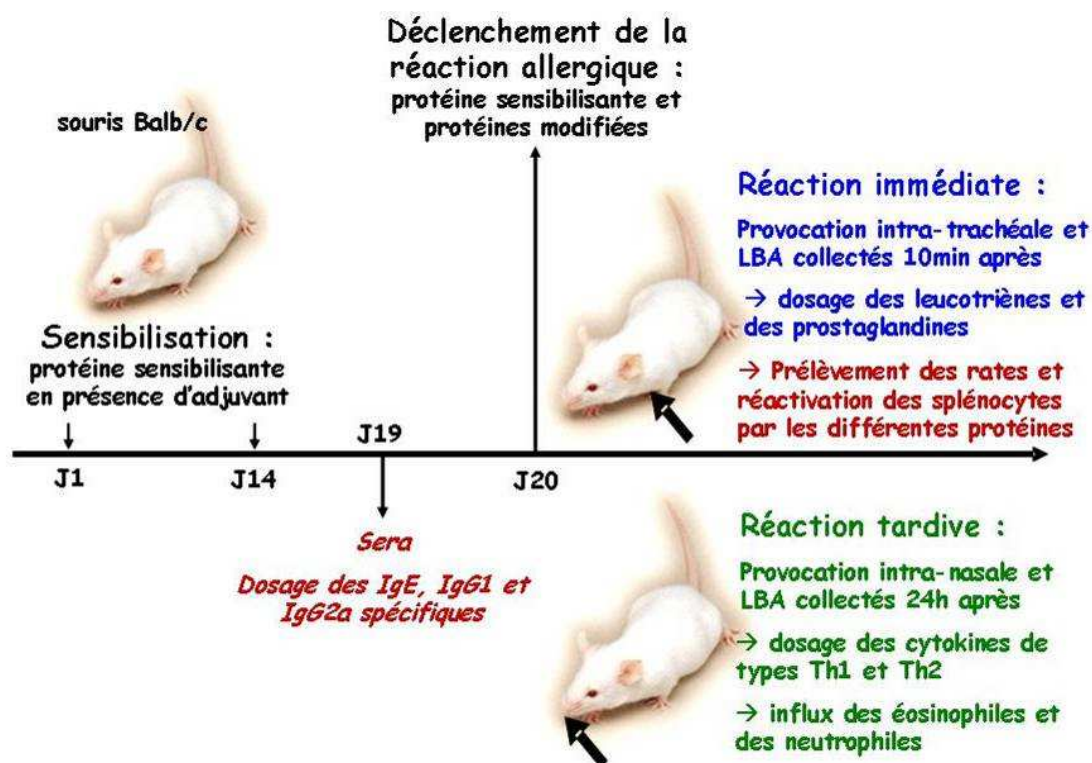


Figure 40 : Principe de l'étude du déclenchement de la réaction allergique chez la souris BALB/c.

En parallèle, nous avons analysé la capacité de liaison à Ara h 1 - N, - C et - CG des IgE de souris induites chez la souris sensibilisée expérimentalement, afin de comparer cette réactivité à celle observée avec les IgE issues de sérums de patients allergiques. Nous avons également réalisé des tests de déclenchement *in vitro* sur cellules RBL 2H3, correspondant à des mastocytes de rat immortalisés. Les IgE de souris peuvent en effet se lier aux récepteurs des IgE de rats, permettant la sensibilisation de ces cellules par les saignées des souris sensibilisées expérimentalement. Les intensités de dégranulation obtenues par Ara h 1 - N, - C et - CG seront ainsi comparées à celles obtenues sur les cellules RBL SX-38 sensibilisées par les IgE de patients allergiques, ainsi qu'aux intensités de la réaction allergique observée *in vivo* chez la souris. En cas de résultats convergents et conformément aux exigences d'ordre éthique, un tel test pourrait remplacer les expériences réalisées *in vivo* chez la souris, limitant ainsi le nombre d'animaux en expérimentation.

II.5.1. Souris

Les souris BALB/cJ femelles, exemptes de pathogènes et opportunistes spécifiques et âgées de 3 à 4 semaines, proviennent du centre d'élevage René Janvier (CERJ). Elles sont maintenues en cages à couvercle filtrant et reçoivent une alimentation irradiée dépourvue de protéines d'arachide. Tous les animaux sont acclimatés au minimum 2 semaines sur le lieu d'expérimentation (animalerie conventionnelle du Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay) avant toute manipulation. Les expérimentations sont conformes aux normes d'éthique de la Communauté Européenne et sont réalisées sous la responsabilité d'une personne habilitée (autorisation 91-122 des services vétérinaires français).

II.5.2. Sensibilisation expérimentale

Deux cents microlitres d'un mélange contenant la protéine sensibilisante et un adjuvant Th2 sont injectés par souris, par voie intra-péritonéale (i.p.), à l'aide de seringues de 1 mL et d'aiguilles de 0,5x16 mm. Une injection de rappel est réalisée de la même façon 2 semaines après la sensibilisation.

Les souris ont été immunisées avec 20 µg de protéines soit émulsionnées avec l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) (Difco, Detroit, Michigan, USA), soit adsorbées sur l'alum (hydroxyde d'aluminium, Alhydrogel, Superfos Biosector als, Danemark).

II.5.2.1. Immunisation en AIF

Un lot de 60 souris a été immunisé par 20 µg de Ara h 1 - N émulsionné avec l'AIF. La solution de Ara h 1 - N diluée en PBS (200 µg/mL) est mélangée volume à volume avec la solution d'AIF, puis le mélange est fortement agité jusqu'à l'obtention d'une émulsion.

II.5.2.2. Immunisation en alum

Un lot de 67 souris a été immunisé avec l'Ara h 1 - N adsorbé sur l'alum. Le gel d'alum est lavé 2 fois par reprise en PBS et centrifugation (100 g, 4°C) successives. La solution d'Ara h 1 - N diluée en PBS (200 µg/mL) et le gel d'alum lavé sont mélangés volume à volume. Ce mélange subit une agitation rotationnelle pendant 18 h à 4°C afin de réaliser l'adsorption passive de l'allergène sur le gel d'alum.

A la suite de ces injections de sensibilisation, les animaux sont répartis de façon aléatoire dans différentes cages, afin de constituer les différents lots de provocation. En parallèle, 10 à 12 souris par expérience ne sont pas immunisées (contrôle souris naïves). Les sérums de ces souris permettront d'évaluer les signaux non spécifiques générés lors des dosages des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de Ara h 1 naturelle ou modifiée.

II.5.3. Confirmation de la sensibilisation

Cinq jours après le rappel d'immunisation (J19), environ 200 µL de sang sont prélevés par souris par ponction dans la veine rétro-orbitale à l'aide de pipette Pasteur préalablement revêtue de tampon EDTA 100 mM. Après centrifugation (10 minutes, 5000 g, 4°C), le sérum est délicatement prélevé avant addition de 5 µL d'azote de sodium à 10%. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

Juste après le prélèvement des LBA faisant suite à la provocation i.t., les souris sont sacrifiées par dislocation des vertèbres et leurs rates sont prélevées.

II.5.3.1. Dosage enzymo-immunologiques des IgE, IgG1 et IgG2a totales et spécifiques de Ara h 1 - N

Les dosages des IgE totales et des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de l'Ara h 1 - N sont réalisés suivant la méthode décrite par Adel-Patient et coll. [398]. Le principe est le même que pour les dosages des IgE dans les sérums humains. Cent microlitres de sérums de souris dilués sont incubés sur des plaques revêtues par un anticorps monoclonal de rat anti-IgE de souris (clone R-3592, BD Biosciences, San Jose, CA, Etats-Unis) pour le dosage des IgE totales (dilution au 1/1000 en tampon EIA) ou par de l'Ara h 1 - N pour le dosage des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques (sérums respectivement dilués aux 1/100, 1/100000 et 1/1000 en tampon EIA). Les concentrations en IgE totales sont déterminées par rapport une gamme étalon réalisée avec un standard IgE de souris dilué en tampon EIA (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, Etats-Unis) pour des concentrations allant de 10 à 0,005 ng/mL. Après incubation pendant 24 h à 4°C, les plaques sont lavées (cycle de 5 lavages) puis les anticorps anti-IgE, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de souris couplés à la G4 [398] sont ajoutés à raison de 100 µL par puits, à la concentration de 2 à 3 UE/mL. Après 3 h d'incubation à 20°C

sous agitation, les puits sont lavés (2 cycles de 5 lavages entrecoupés par une agitation pendant 5 min dans du tampon de lavage), puis 200 µL de réactif d'Ellman sont déposés dans chaque puits. Les mesures de l'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 414 nm à différents temps.

Les IgG spécifiques présentes dans les sérums de souris pouvant interférer dans le dosage des IgE spécifiques par EAST, les dosages des IgE spécifiques ont également été réalisés après déplétion des IgG suite à un passage sur protéine G, selon le même protocole que précédemment décrit (première partie, paragraphe II.4.3.2, [399]). Ces expériences ont été réalisées en constituant des pools de sérums en fonction des groupes de provocation. Ces dosages ont permis de s'assurer de l'homogénéité de la réponse IgE spécifiques de Ara h 1 - N entre les différents groupes de souris sensibilisées constitués pour les provocations par les différentes préparations de Ara h 1.

II.5.3.2. Dosage des cytokines Th1/Th2 sécrétées par les splénocytes des souris immunisées

II.5.3.2.a. Mise en culture et réactivation des splénocytes

A J21, après le test de provocation par voie i.t. puis le prélèvement des LBA (voir plus loin paragraphe II.5.6.1.a), les souris sont humanement sacrifiées. Leurs rates sont prélevées puis poolées par lot de provocation afin de confirmer la sensibilisation des souris et l'homogénéité des différents lots constitués. Des suspensions cellulaires sont alors réalisées en RPMI 1640 complété par du SVF (10%), 2 mM de L-glutamine, 100 U de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (milieu complet). Après une première centrifugation des splénocytes (400 g, 10 min, 4°C), les érythrocytes sont lysés par reprise et incubation du culot cellulaire en tampon de lyse (180 mM de NH₄Cl et 17 mM de Na₂EDTA ; 10 min à 20°C). Après deux lavages successifs, le culot cellulaire est finalement repris dans 20 mL de milieu complet, et les amas cellulaires sont séparés par lente décantation à température ambiante. Après prélèvement de la suspension cellulaire, une numération au bleu trypan est effectuée, permettant de vérifier que la viabilité cellulaire est supérieure à 95%. Les suspensions cellulaires sont alors ajustées à 5,5.10⁶ cellules/mL, puis distribuées à raison de 180 µL/puits en plaque de culture 96 puits. Les activateurs dilués en PBS sont ensuite ajoutés en quadruplicat, à raison de 20 µL/puits :

- PBS stérile (contrôle négatif)

- Ovalbumine (contrôle de la spécificité de l'activation), 25 µg/mL final
- Concanavaline A (contrôle positif), 1 µg/mL final
- Ara h 1 - N, - C ou - CG à 25, 5 ou 1 µg/mL final.

Après 60 h d'incubation à 37°C, sous 5% de CO₂ et 95% d'humidité, les plaques sont centrifugées (300 g, 10 min, 4°C) et les surnageants sont prélevés et aliquotés. Ils sont conservés à -80°C avant de doser leur contenu en cytokines de types Th1 et Th2.

II.5.3.2.b. Dosage des cytokines Th1/Th2

Le dosage des cytokines de types Th1 et Th2 est réalisé en duplicat par la technologie xMAP Luminex, sur appareillage BioPlex, en utilisant un kit de chez Biorad (Mouse Th1/Th2 Panel (X 200 000 3J7 171-F11081) selon les instructions données par le fournisseur. Cette technologie permet le dosage simultané, dans le même puits et sur un faible volume d'échantillon, de plusieurs molécules. Les cytokines dosées ici sont l'IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), GM-CSF, IFN-γ et TNF-α. Les limites de détection obtenues sont équivalentes à celles obtenues en ELISA classique, et les CV entre duplicats sont inférieurs à 10%.

II.5.4. Etude de la capacité de liaison des allergènes naturels/modifiés aux IgE de souris sensibilisées expérimentalement

La capacité de liaison des allergènes naturels/modifiés a dans un premier temps été analysée par EAST, sur plaque revêtues par Ara h 1 - N, - C ou - CG, selon le même protocole que dans le paragraphe II.5.3.1.

Dans un second temps, des tests d'inhibition en capture d'IgE ont été réalisés. Le principe de ce test reprend les conditions du test décrit précédemment pour l'analyse de la capacité de liaison des IgE humaines (paragraphe II.3.2). Il a été adapté à l'étude du modèle souris pour ses caractéristiques de sensibilité. Toutefois, il ne permet pas de quantifier en l'absence d'étalon interne.

Les pools des sérums des souris sensibilisées sont déposés dans les puits d'une plaque revêtue par un anticorps anti-IgE de souris (clone LOME-3) dilués en tampon EIA. La dilution optimale des pools de sérums est déterminée à l'aide des résultats obtenus lors du dosage des IgE spécifiques de l'allergène. Après une incubation de 24 h à 4°C et lavage. La compétition est réalisée par ajout simultané du compétiteur (25 µL/puits) et de l'allergène

couplé à la G4 (25 μ L par puits, à 2 UE/mL final). Les compétiteurs sont des solutions contenant des concentrations croissantes connues des différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée) et les allergènes traceurs correspondent à Ara h 1 - N - G4 ou Ara h 1 grillée - G4. Après 4 h d'incubation à 20°C sous agitation, la plaque est lavée puis la liaison IgE-allergène traceur est révélée en ajoutant 200 μ L de réactif d'Ellman par puits. La mesure de l'absorbance à 414 nm est réalisée à différents temps. Après soustraction de la valeur témoin obtenue en présence de sérum de souris naïves, les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison « B/B0 », où B0 et B représentent respectivement le signal net de liaison du traceur aux IgE en l'absence (signal maximal) ou en présence de compétiteur. Les concentrations nécessaires pour inhiber 50% de la liaison des IgE au traceur (IC50) sont alors déterminées.

II.5.5. Etude *in vitro* du potentiel de déclenchement des allergènes naturels ou modifiés à l'aide des IgE de souris sensibilisées expérimentalement

Des dosages de β -hexosaminidase sur cellules RBL 2H3 (mastocytes de rat) activées ont été réalisés afin d'étudier le potentiel de dégranulation des différentes préparations de Ara h 1 *in vitro*, à l'aide des sérums de souris sensibilisées expérimentalement. Nous avons donc mis au point le test de dégranulation sur cellules RBL 2H3 (fournies par U. Blank ; Inserm, Unité E-0225, faculté de médecine Xavier-Bichat), de la même façon que pour la mise au point du modèle cellulaire avec les cellules RBL SX-38. La lignée cellulaire a été sous clonée afin de sélectionner un clone ayant une bonne capacité de dégranulation. Le test a été adapté au format 96 puits en calibrant le nombre de cellules à ensemercer par puits. La quantité d'IgE de souris à déposer par puits pour obtenir une sensibilisation optimale a été définie. Finalement, plusieurs anticorps anti-IgE murines ont été testés pour définir la dégranulation de référence. Nous ne détaillerons pas la mise au point de ce modèle cellulaire et seules les conditions expérimentales optimisées seront données.

Le premier jour, des cellules RBL 2H3 pré-confluentes sont décollées comme décrit précédemment (première partie, paragraphe II.4.1.2). Les cellules sont ensemençées sur des plaques de culture 96 puits dans du milieu de culture complet à raison de 10^4 cellules/puits. Elles sont ensuite mises en culture pendant 24 h. Après un lavage en PBS, les cellules sont

incubées avec 100µL des pools de saignées de souris sensibilisées dilués à 25 ng/mL d'IgE totales en milieu de culture sans SVF. Après 24 h d'incubation avec les sérums de souris, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon NaPIPES (composition première partie, paragraphe II.4.3.3). Le dernier lavage est réalisé par une incubation sous agitation modérée (150 rpm) de 15 min avec le tampon NaPIPES afin de bien laver les cellules. Les différents activateurs sont ensuite incubés en duplicat (50 µL/puits, dilués dans du tampon NaPIPES) à 37°C sous agitation (150 rpm) (incubateur INFORS, Bottmingen, Suisse). Ces activateurs correspondent à des gammes de concentrations en Ara h 1 - N, - C, - CG ou Ara h 1 grillée diluées de 100 pg/mL à 100 µg/mL.

Des contrôles sont réalisés systématiquement pour chaque sérum :

- la *dégranulation basale* est mesurée en activant les cellules sensibilisées avec le tampon NaPIPES seul,
- le *contenu total en β -hexosaminidase* est mesuré par lyse des cellules avec du Triton X-100 (1% final),
- la *dégranulation de référence, IgE-dépendante*, est mesurée en pontant les IgE avec un anticorps monoclonal anti-IgE de souris (clone R35-92) dilué à 100 ng/mL.

L'intensité de la dégranulation est mesurée par le dosage dans le surnageant de la β -hexosaminidase comme décrit précédemment (première partie, paragraphe II.4.3.4).

Un témoin positif de dégranulation est réalisé à chaque expérience en sensibilisant les cellules avec le standard d'IgE de souris dilué à 25 ng/mL (le même que celui utilisé pour les dosages d'IgE totales dans les saignées (paragraphe II.5.3.1)) et en activant les cellules par l'anti-IgE de souris.

II.5.6. Test de déclenchement *in vivo* chez la souris sensibilisée expérimentalement

II.5.6.1. Mesure des paramètres de la réaction allergique immédiate

Afin de mesurer les marqueurs précoces de la réaction allergique, les souris immunisées subissent un test de provocation sous anesthésie par voie i.t. par une solution de Ara h 1 - N, - C ou - CG ou par une solution saline (0,9 % de NaCl) en contrôle. Quatre lots de 8 souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF et 4 lots de 8 souris immunisées par

Ara h 1 - N en alum ont ainsi été constitués, chacun recevant une des solutions de provocation. Un lot de 5 souris non immunisées et non provoquées sert également de contrôle négatif.

Lors d'une expérience préliminaire, des souris non immunisées ont été provoquées par les différentes solutions de provocation afin de s'assurer de la spécificité du déclenchement de la réaction allergique (5 souris par lot).

II.5.6.1.a. Test de provocation et prélèvement des LBA

Au 22^{ème} jour après la première immunisation, les souris sont profondément anesthésiées par injection de 200 µL d'un mélange de xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer HealthCare, 2 mg/mL) et de kétamine (Imalgène[®] 1000, Merial, 15 mg/mL) par voie intrapéritonéale. L'efficacité de l'anesthésie est contrôlée par le test de retrait de la patte. Après incision, la trachée de la souris est alors délicatement dégagée et la souris est placée en position verticale. Cinquante microlitres de la solution de déclenchement à 400 µg/mL (ce qui correspond à 20 µg de protéine par souris) sont injectés dans la trachée à l'aide d'une seringue Myjector U-100 Insulin, Terumo ; 0,33x12 mm). Après 10 min de réaction, le LBA est prélevé : la trachée est légèrement entaillée et une fine tubulure y est insérée. Deux lavages successifs des poumons sont alors réalisés par injection et récupérations lentes de 0,8 mL de PBS à 4°C. La souris est sacrifiée par dislocation des vertèbres dès la fin des prélèvements. Le LBA prélevé est rapidement filtré afin d'éliminer les cellules présentes (filtres de 0,45 µm), puis aliquoté en 2 tubes qui sont immédiatement congelés par immersion dans l'azote liquide avant d'être placés à -80°C jusqu'à la réalisation des dosages. Tous les LBA sont traités individuellement.

II.5.6.1.b. Dosages des leucotriènes et des prostaglandines dans les LBA

Les dosages des leucotriènes (LTB₄, LTC₄ et LTE₄) et des prostaglandines (PGD₂) sont effectués par des tests enzymo-immunologiques de type compétitif [400;401]. Les réactifs (antisérums et traceurs) utilisés dans ces dosages ont été gracieusement fournis par SPI-BIO/Bertin.

II.5.6.2. Mesure des paramètres de la réaction tardive

Afin de mesurer les paramètres tardifs de la réaction allergique, les souris immunisées subissent un test de provocation par voie i.n. avec des solutions contenant Ara h 1 - N, - C, - CG ou par une solution saline (0,9 % de NaCl) en contrôle. Quatre lots de 7 souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF et 4 lots de 9 souris immunisées par Ara h 1 - N en alum ont été constitués, chacun recevant une des solutions de provocation. Un lot de 5 souris non immunisées et non provoquées sert également de contrôle négatif.

Lors d'une expérience préliminaire, des souris non immunisées ont été provoquées par les différentes solutions de provocation afin de s'assurer de la spécificité du déclenchement de la réaction allergique (5 souris par lot).

II.5.6.2.a. Test de provocation et prélèvement des LBA

Au 20^{ème} jour après la première immunisation, les souris sont légèrement anesthésiées sous isoflurane (Baxter). Cinquante microlitres de la solution de déclenchement sont alors déposés goutte à goutte sur la narine de la souris qui l'inspire au fur et à mesure des dépôts. Vingt quatre heures après, les souris sont anesthésiées par injection de 200 µL d'un mélange de xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer HealthCare, 2 mg/mL) et de kétamine (Imalgène[®] 1000, Merial, 15 mg/mL) par voie i.p.. Le prélèvement des LBA est réalisé comme décrit précédemment (paragraphe II.5.6.1.a), excepté que le LBA prélevé n'est pas filtré. Les LBA collectés sont conservés dans la glace jusqu'au dernier prélèvement. Tous les LBA sont traités individuellement.

II.5.6.2.b. Analyse de l'influx cellulaire dans les LBA

Une fois le prélèvement des LBA effectué, 250µL de chaque LBA sont dilués au 1/4 en solution saline. Cent microlitres de cette solution sont prélevés pour réaliser une numération des cellules totales sur hémacytomètre (cellule de Malassez). La viabilité cellulaire est évaluée par coloration au bleu trypan (colorant d'exclusion, Sigma). Le reste de la solution est utilisé pour réaliser le comptage différentiel des cellules. Les cellules sont centrifugées sur lame (cytopspin 10 min, 2000 g), fixées puis colorées (DiffQuick, LaboModerne, France). Les lames sont ensuite analysées au microscope à immersion. Les neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes et macrophages sont identifiés individuellement sur

critère morphologique. Au total, pour chaque LBA (et donc chaque souris), 200 à 400 cellules sont analysées et comptées.

II.5.6.2.c. Dosage des cytokines Th1/Th2 dans les LBA

Le dosage des cytokines de types Th1 et Th2 est réalisé au BioPlex en utilisant un kit de chez Biorad (Mouse Th1/Th2 Panel (X 200 000 3J7 171-F11081)) selon les instructions données par le fournisseur et comme précédemment décrit (paragraphe II.5.3.2.b).

II.5.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad. Les groupes ont été comparés en utilisant une analyse de variance suivie d'un test de Tukey. Des tests t ont également été réalisés pour mettre en valeur des différences entre certains groupes.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. ANALYSE DES PROFILS DE SENSIBILISATION AUX ALBUMINES 7S DE L'ARACHIDE, DE LA NOISETTE, DU SOJA ET DU POIS CHEZ LES PATIENTS ALLERGIQUES

La sensibilisation aux albumines 7S des sérums de patients allergiques à l'arachide, à la noisette, au soja et au pois a été mesurée par tests d'EAST, puis confirmée pour l'arachide par capture des IgE.

III.1.1. Dosages des IgE spécifiques de la globuline 7S du pois et du soja dans les sérums de patients allergiques

Pour les sérums 3S et 4S de patients allergiques au soja, les concentrations en IgE totales sont de 2470 et 96 UI/mL respectivement. Seul le sérum 3S a montré de faibles concentrations d'IgE spécifiques de la globuline 7S du soja (2,3 UI/mL).

Un seul sérum de patient allergique au pois a pu être collecté. La sensibilisation de ce sérum à l'albumine 7S n'a pas été testée.

III.1.2. Profils de sensibilisation aux allergènes de noisette selon l'origine géographique des patients

Les IgE totales et spécifiques des allergènes de la noisette Cor a 11, Cor a 9, rCor a 1.04 et rCor a 8 ont été dosées dans les 21 sérums de patients allergiques à la noisette collectés. Les résultats sont donnés dans le tableau 24, les sérums étant classés en fonction de l'origine géographique des patients. Les concentrations en IgE totales dans ces sérums montrent une grande variabilité, de moins de 15 UI/mL à plus de 4500 UI/mL. Six des 7 patients provenant de Suisse et de l'Est de la France, 9 des 11 patients provenant de Grèce et les 3 patients provenant d'Espagne sont sensibilisés à au moins un des 4 allergènes testés. Si l'on regarde le profil de sensibilisation selon l'origine géographique des patients, on note que

les 6 sérums de patients sensibilisés provenant d'Allemagne et de l'Est de la France présentent uniquement des IgE spécifiques de Cor a 1.04. Deux sérums sur les 3 provenant d'Espagne ont des IgE spécifiques de Cor a 1.04. A l'inverse, aucun des sérums de patients sensibilisés provenant de Grèce ne présente des IgE spécifiques de Cor a 1.04. Par contre, 8 de ces 9 patients ont des IgE spécifiques de Cor a 8, ainsi que 2 sérums sur les 3 provenant d'Espagne. Sur l'ensemble de notre population, peu de patients sensibilisés à la noisette possèdent des IgE spécifiques de Cor a 11 ou de Cor a 9. Ils proviennent uniquement de Grèce (5/9 et 3/9 respectivement) et d'Espagne (1/3 dans chaque cas). Aucune réponse IgE spécifique de Cor a 11 ou Cor a 9 n'a été détectée chez les patients suisses ou français.

Tableau 24 : Dosage des IgE totales et spécifiques de Cor a 11, Cor a 9, rCor a 1.04 et rCor a 8 dans les sérums de patients allergiques à la noisette

Sérums	Origine	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques (UI/mL)			
			Cor a 11 (globuline 7S)	Cor a 9 (globuline 11S)	rCor a 1.04 (homologue de Bet v 1)	rCor a 8 (nsLTP)
50N	Suisse	275	-	-	31	-
51N		4350	-	-	110	-
5N	Est de la France	19	-	-	2,5	-
6N		183	-	-	85	-
7N		52	-	-	11	-
8N		< 15	-	-	-	-
9N		757	-	-	135	-
13A/N	Grèce	176	-	-	-	10
14A/N		891	1,5	-	-	9,3
15A/N		< 15	-	-	-	2,4
16A/N		189	1,9	-	-	-
17A/N		898	-	-	-	8,2
18A/N		118	-	-	-	-
19A/N		861	0,9	-	-	135
20A/N		500	3,2	4,7	-	9,5
21A/N		1027	85	72	-	2,2
22A/N		1591	-	4,8	-	67
23A/N		29	-	-	-	-
25N	Espagne	779	-	-	2,1	14
26N		72	-	0,8	-	-
27N		4537	4,6	-	4,5	11

- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL).

Ces résultats confirment la sensibilisation majeure à la LTP (Cor a 8) dans les populations méditerranéennes tandis que les populations du nord de l'Europe sont plutôt

sensibilisées à l'homologue de Bet v 1, Cor a 1.04. En effet, Hansen et coll. ont montré que 94% des patients d'Europe du Nord allergiques à la noisette sont sensibilisés à rCor a 1.04 [225]. De même, Lauer et coll. avaient montré dans une population suisse et allemande de patients allergiques à la noisette que 98% étaient sensibilisés à rCor a 1.04 [222]. Les patients de ces études qui n'ont pas, par ailleurs, d'IgE spécifiques de Cor a 8, développent fréquemment des symptômes allergiques localisés à la cavité buccale, associée à une pollinose au bouleau. Chez les patients du bassin méditerranéen, le profil de sensibilisation et les manifestations allergiques sont différentes. Nous avons pu voir que Cor a 8 était l'allergène majoritaire, confirmant en cela les travaux précédemment décrits [219;220;226]. La pollinose associée au bouleau est rare dans ces populations, et les symptômes engendrés correspondent à une allergie alimentaire vraie. Les profils de sensibilisation aux allergènes de noisette varient donc géographiquement et en fonction de l'existence d'une sensibilisation associée au pollen de bouleau.

Les résultats obtenus sur notre population démontrent par ailleurs que la globuline 7S (Cor a 11) et la globuline 11S (Cor a 9) de la noisette se révèlent être des allergènes mineurs. Beyer et coll. ont pourtant identifié la globuline 7S de la noisette comme étant un allergène reconnu par 86% des 14 sérums de patients américains ayant des réactions systémiques sévères [221]. Ces observations apparaissent en contradiction avec d'autres études européennes. De même, la globuline 7S a également été identifiée comme étant un allergène mineur [222]. Tous ces résultats sont surprenants car ces protéines appartiennent à des familles de protéines qui, dans d'autres aliments, contiennent des allergènes majeurs tels que Ara h 1 (globulines 7S) et Ara h 3 (globuline 11S) de l'arachide.

III.1.3. Sensibilisation des patients allergiques à l'arachide

Les IgE totales et spécifiques de l'EPBA ont été dosées dans les 45 sérums de patients allergiques à l'arachide collectés dans le cadre du programme EuroPrevall (tableau 25) et dans le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. La grande majorité de ces sérums proviennent de Grèce (36/45). Le dosage des IgE totales dans ces sérums révèle une grande hétérogénéité de la réponse (de moins de 15 à plus de 15 000 UI/mL). Le dosage des IgE spécifiques démontre que sur ces 45 sérums, seulement 14 ont des IgE spécifiques de l'EPBA. Comme attendu, des IgE spécifiques de l'EPBA sont présentes dans le pool de 76 sérums de

patients allergiques à l'arachide servant de témoin positif, et ne sont pas détectées dans le témoin négatif (sérum d'un individu non allergique). Excepté pour un sérum qui provient de Suisse (1A), tous les sérums négatifs en EAST proviennent de Grèce. Les 31 sérums ne présentant pas d'IgE spécifiques de l'arachide détectées par EAST ont alors été analysés en capture d'IgE (IgE spécifiques de l'EPBA, Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6). Trois sérums ont montré des réponses très faibles en IgE spécifiques, les autres demeurant négatifs dans ce format de dosage pour toutes les protéines ou extraits protéiques d'arachide testés (non montré). L'existence d'une spécificité particulière, non recherchée avec les méthodes et marqueurs allergéniques utilisés, pourrait être une hypothèse. Une sensibilisation propre aux patients allergiques grecs, et différente des autres populations, par exemple à la LTP (Ara h 9) comme observée dans le cadre de l'allergie à la noisette, pourrait ainsi être à l'origine de ces différences. Une autre hypothèse serait que ces patients n'aient pas une allergie IgE-médiée.

Parmi les sérums ayant des IgE spécifiques de l'EPBA en EAST, 6 proviennent de Grèce (21A/N, 22A/N, 39A, 41A, 44A et 49A), un de Suisse (2A) et 7 des Pays-Bas (52A à 58A). Ces sérums ont des taux d'IgE spécifiques de l'EPBA compris entre 0,4 et 400 UI/mL. Les valeurs d'IgE spécifiques obtenues pour les sérums provenant des Pays-Bas sont proches des valeurs obtenues indépendamment en RAST par les cliniciens (tableau 19), confortant la fiabilité de nos dosages.

Tableau 25 : Dosage des IgE totales et spécifiques de l'EPBA dans les sérums des patients allergiques à l'arachide collectés dans le cadre d'EuroPrevall.

Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques de l'EPBA (UI/mL)	Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques de l'EPBA (UI/mL)	Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques de l'EPBA (UI/mL)
1A	920	-	28A	445	-	44A	140	1,2
2A	895	50	29A	160	-	45A	810	-
10A	78	-	30A	2675	-	46A	1370	-
11A	70	-	31A	280	-	47A	190	-
12A	< 15	-	32A	330	-	48A	820	-
13A/N	175	-	33A	745	-	49A	885	1,8
14A/N	890	-	34A	19	-	52A	4370	185
15A/N	< 15	-	35A	220	-	53A	34	15
16A/N	190	-	36A	27	-	54A	845	110
17A/N	900	-	37A	69	-	55A	1325	400
18A/N	120	-	38A	110	-	56A	355	95
19A/N	860	-	39A	53	0,4	57A	15700	46
20A/N	500	-	40A	90	-	58A	1130	195
21A/N	1030	9,3	41A	135	0,5	pool	960	160
22A/N	1590	3,5	42A	40	-	T-	19	-
23A/N	29	-	43A	300	-			

- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL).

III.1.4. Conclusions et nouveaux objectifs

La faible sensibilisation à la globuline 7S de la noisette, et l'absence de sérums de patients allergiques au pois et au soja, nous ont conduits à redéfinir nos modèles d'étude pour l'évaluation de l'effet de différents procédés/traitements sur l'allergénicité. Un seul modèle, à savoir Ara h 1, a été adopté. Par contre, il s'est appuyé sur une population d'étude élargie par incorporation de 9 sérums issus de la sérothèque du laboratoire, constituée en collaboration avec le Dr E. Paty (sur fond orange dans le tableau 26), et de 12 sérums de patients allergiques à l'arachide collectés préalablement dans le cadre du programme Allergest (après accord du Dr. Z. Sepfalusi, sur fond gris dans le tableau 26). Ces sérums présentent des concentrations en IgE totales comprises entre 23 et 2700 UI/mL et en IgE spécifiques de l'EPBA entre 0,4 et 205 UI/mL. Les sérums sélectionnés pour la suite de nos travaux sont indiqués en italique dans les tableaux 25 et 26.

Tableau 26 : Dosage des IgE totales et spécifiques de l'EPBA dans d'autres sérums de patients allergiques à l'arachide

Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques de l'EPBA (UI/mL)	Sérums	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques de l'EPBA (UI/mL)
1691	205	83	181	770	0,4
1682	35	19	407	51	0,9
2205	960	86	437	620	135
2206	1680	24	448	1080	8,4
2207	230	54	449	510	11
2208	125	12	488	710	205
2209	2680	115	497	1045	73
2303	32	1,3	505	1405	3
2304	460	140	415	875	5,9
2305	1795	89			
2306	135	19			
2308	23	11			

Les sérums sur fond gris ont été collectés dans le cadre d'Allergest et ceux sur fond orange sont issus de la sérothèque constituée en collaboration avec le Dr E. Paty.
- : inférieur à la limite de détection (0,1 UI/mL).

III.2. EFFETS DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR L'ALLERGENICITE DE LA GLOBULINE 7S DE L'ARACHIDE (Ara h 1)

L'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h 1 a été évalué à l'aide des sérums humains préalablement sélectionnés en fonction de leur teneur en IgE spécifiques de Ara h 1 - N, ainsi que *in vivo* sur un modèle animal. Les différentes formes de Ara h 1 produites (- N, - C et - CG) ont été testées afin d'étudier l'influence d'un chauffage en solution, en présence ou non de glucose, ou d'un grillage dans la graine d'arachide sur l'allergénicité de Ara h 1. La comparaison de Ara h 1 - CG avec Ara h 1 grillée permettra de voir si les changements de l'allergénicité de Ara h 1 dépendent d'interactions et de modifications de structure qui se produisent indépendamment ou non de la matrice de la graine d'arachide.

III.2.1. Evaluation de l'effet de traitements thermiques sur la capacité de liaison aux IgE de patients allergiques à l'arachide

III.2.1.1. Analyse des IgE spécifiques par dosage EAST

Nous avons tout d'abord comparé la capacité de liaison aux IgE de Ara h 1 - N vs modifiée (Ara h 1 - C et - CG) et Ara h 1 grillée en effectuant des EAST avec les allergènes natif ou modifiés immobilisés passivement sur plaques de microtitration. Les résultats sont présentés ici pour 12 des sérums préalablement sélectionnés et le pool de sérums de 76 patients allergiques à l'arachide. Les analyses statistiques en utilisant un test de signe et rang non paramétrique (test de Wilcoxon) démontrent une diminution significative de la capacité de liaison aux IgE de Ara h 1 après chauffage en solution (figure 41). La présence ou non de glucose n'a pas d'effet sur cette diminution. Notons que Ara h 1 issue d'arachide grillée présente une plus forte capacité de liaison aux IgE que les autres préparations de Ara h 1 issues d'arachide crue.

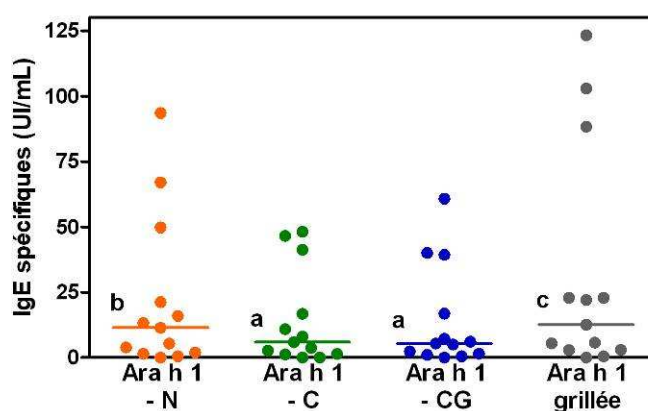


Figure 41 : Capacité de liaison aux IgE par EAST sur des plaques revêtues de Ara h 1 – N (naturelle), - C (chauffée) et - CG (chauffée en présence de glucose) ou de Ara h 1 grillée

a, b et c indiquent des différences de résultats entre les EAST par le test de signe et rang de Wilcoxon ($p < 0,001$).

Ces premiers résultats suggèrent que l'immunoréactivité de Ara h 1 est modifiée par le chauffage. Cependant, l'efficacité de l'immobilisation des protéines peut différer selon les protéines. L'adsorption des protéines peut de plus induire des changements de structure des

allergènes adsorbés et entraîner des biais sur la capacité de liaison aux IgE. Nous avons donc effectué des études complémentaires par des tests d'inhibition.

III.2.1.2. Analyse par test d'inhibition en capture d'IgE

Le format adopté pour les inhibitions repose sur la capture des IgE. Dans ce format et selon les conditions utilisées, la compétition ne sera pas influencée par les IgG spécifiques présentes dans les sérums, et la sensibilité s'en trouvera améliorée. Dans un premier temps, les dilutions optimales des sérums pour réaliser les tests d'inhibition ont été déterminées.

III.2.1.2.a. Détection des IgE spécifiques de Ara h 1 - N en capture d'IgE

Les résultats des tests en capture d'IgE avec un traceur Ara h 1 - N couplé à la G4 sont montrés pour différentes dilutions des 26 sérums préalablement sélectionnés, ainsi que pour le pool des 76 sérums de patients allergiques à l'arachide (figure 42). Tous les sérums testés montrent une réponse IgE significative lors de l'utilisation du traceur Ara h 1 - N. Des signaux faibles sont observés pour 5 sérums (21N, 22A, 53A, 57A, 2303), tandis que la majorité des sérums présentent des signaux supérieurs à 1000 mA, y compris pour certains à des dilutions au 1/20.

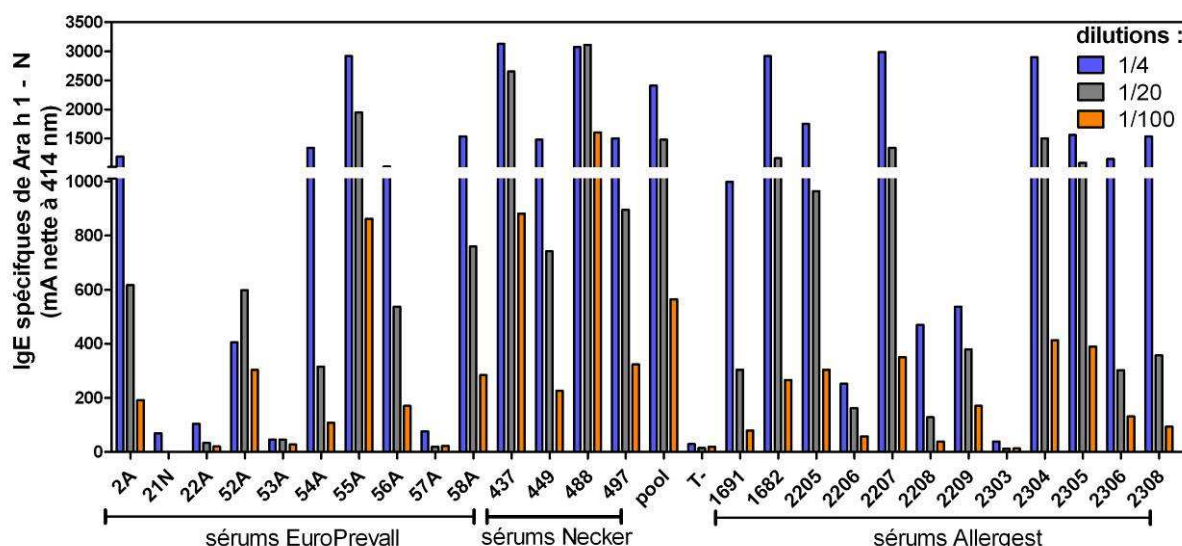


Figure 42 : Détection des IgE spécifiques de Ara h 1 - N en capture d'IgE effectuée avec les sérums de patients allergiques à l'arachide dilués au 1/4, 1/20 et 1/100.

Six sérums collectés dans le cadre d'Europrevall (2A, 52A, 54A, 55A, 56A et 58A), les 4 sérums collectés à l'hôpital Necker, 9 sérums collectés lors du programme Allergest

(1691, 1682, 2205, 2207, 2209, 2304, 2305, 2306 et 2308) et le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide ont des signaux particulièrement forts, permettant de réaliser les tests de compétition.

III.2.1.2.b. Tests de compétitions de Ara h 1 - N vs Ara h 1 - C et - CG en capture d'IgE

Les 19 sérums individuels sélectionnés ainsi que le pool de sérums de patients allergiques à l'arachide ont ainsi été utilisés dans les tests de compétition. Les IgE sériques sont capturées sur une plaque revêtue par un anticorps anti-IgE humaines (clone LE27), en utilisant les dilutions optimales déterminées pour chaque sérum lors de l'expérience précédente. Des gammes de concentration des allergènes Ara h 1 - N, - C, - CG ou grillée sont ensuite incubés en même temps que le traceur Ara h 1 - N couplé à la G4. A titre d'exemple, les courbes d'inhibitions obtenues avec le pool de sérums de 76 patients allergiques à l'arachide, un sérum collecté dans le cadre d'Europrevall (56A) et un sérum provenant de l'hôpital Necker (n°488) sont représentées figure 43.

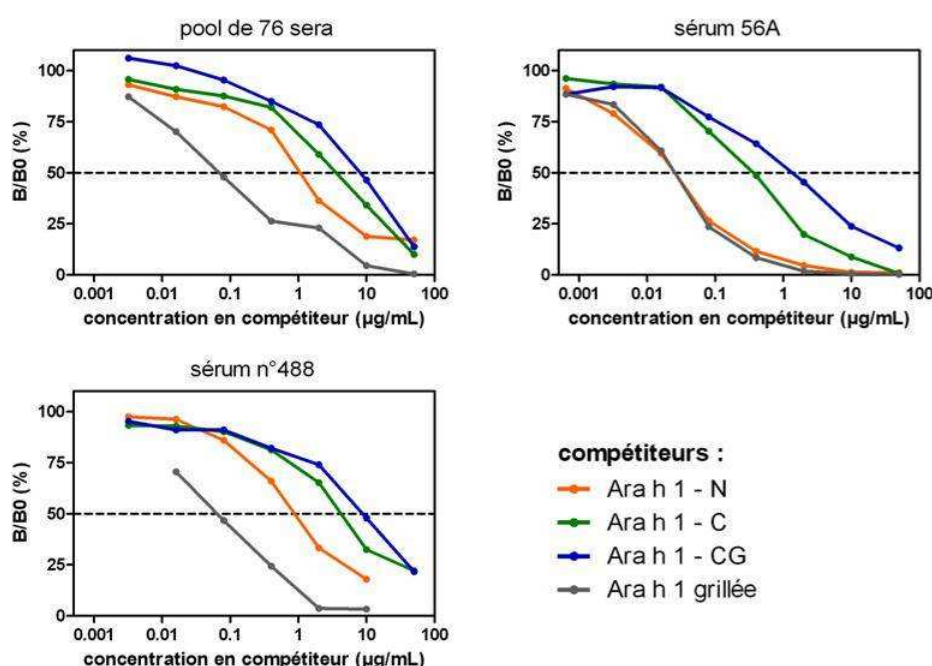


Figure 43 : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques au traceur Ara h 1 - N - G4, obtenues pour le pool de 76 sérums et 2 sérums individuels (56A et n°488) de patients allergiques à l'arachide.

Pour ces 3 exemples, l'inhibition de la liaison IgE au traceur Ara h 1 - N est plus difficile avec les formes traitées de Ara h 1 qu'avec la forme native. Par contre, l'inhibition

est plus aisée avec Ara h 1 grillée qu'avec Ara h 1 native. Toutefois, pour le seul sérum 56A, les courbes d'inhibition par Ara h 1 - N et Ara h 1 grillée sont identiques. Des courbes d'inhibition ont été obtenues pour tous les sérums sélectionnés, et les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées pour tous les sérums et tous les allergènes considérés. Le tableau 27 regroupe l'ensemble de ces données.

Tableau 27 : IC₅₀ (µg/mL) obtenues en test de capture d'IgE avec Ara h 1 - N, - C et - CG et Ara h 1 grillée en compétiteurs.

Sérums	IC ₅₀ (µg/mL) contre le traceur Ara h 1 - N - G4			
	Ara h 1 - N	Ara h 1 - C	Ara h 1 - CG	Ara h 1 grillée
2A	0,09	0,05	0,2	0,02
52A	0,03	0,2	1,2	0,02
54A	0,08	1,7	26	0,05
55A	0,02	0,2	1,1	0,02
56A	0,02	0,3	1,2	0,02
58A	0,08	1,3	12	0,04
437	0,3	0,2	0,6	0,05
449	8	23	38	0,08
488	1	4	8	0,01
497	0,2	1	3	0,05
1691	0,2	0,1	0,5	0,19
1682	0,7	1,6	2,9	0,03
2205	0,06	0,05	0,2	0,07
2207	0,8	1,6	2,4	0,01
2209	0,08	0,2	0,8	0,03
2304	0,2	1,4	6,4	0,05
2305	0,07	0,2	0,1	0,01
2306	0,03	0,04	0,1	0,01
2308	0,01	0,01	0,07	0,03
pool de 76 sérums	1,1	2,3	5,7	0,07

L'Ara h 1 grillée a une immunoréactivité identique ou plus forte que Ara h 1 - N (issue d'arachide crue) : pour certains sérums, notamment les sérums français, il faut jusqu'à 100 fois moins de Ara h 1 grillée que de Ara h 1 - N pour inhiber 50% des liaisons des IgE à Ara h 1 - N.

Pour 6 des sérums testés (sérums 2A, 437, 1691, 2205, 2306 et 2308), l'immunoréactivité de Ara h 1 est inchangée après chauffage en solution. Pour les 13 autres sérums et le pool de 76 sérums, elle est diminuée après ce traitement : 2 à 20 fois plus de Ara h 1 - C que de Ara h 1 - N sont nécessaires pour inhiber 50% des liaisons de l'Ara h 1 - N

aux IgE. La présence de glucose pendant le chauffage entraîne une perte encore plus forte de l'immunoréactivité de Ara h 1 : pour tous les sérums, il faut jusqu'à 15 fois plus de Ara h 1 - CG que de Ara h 1 - C pour inhiber 50% des liaisons des IgE au traceur Ara h 1 - N.

Des tests de type compétitifs ont également été réalisés en étudiant l'inhibition de la liaison des IgE à un traceur Ara h 1 grillée. Dans ce cas de figure, nous avons observé que la liaison des IgE au traceur Ara h 1 - grillée est difficile à déplacer par les protéines Ara h 1 issue d'arachide crue (- N, - C ou - CG). Par contre, l'Ara h 1 grillée a montré des inhibitions avec des valeurs d'IC50 comprises entre 10 et 100 ng/mL (non montré). Dans le cas où les inhibitions ont été significatives, on obtient le même ordre d'immunoréactivité qu'observé précédemment : Ara h 1 grillée est plus immunoréactive que Ara h 1 - N, tandis que le chauffage de Ara h 1 en solution entraîne une perte de son immunoréactivité non compensée par l'addition de glucose lors du traitement.

Ces résultats obtenus par inhibition en capture d'IgE confirment ceux obtenus par EAST direct sur des plaques revêtues par les différentes formes de Ara h 1 - N, - C ou - CG. L'ensemble des résultats démontre la perte d'immunoréactivité après chauffage en solution à 100°C. La présence de glucose pendant le chauffage entraîne une diminution encore plus forte de l'immunoréactivité de Ara h 1 pour la majorité des sérums. Il est à noter que, au cours du programme Allergest, il avait été montré que Ara h 1 issue d'arachide grillée était plus immunoréactive que Ara h 1 issue d'arachide crue ou bouillie. Nous retrouvons ici ces différences entre l'Ara h 1 grillée et Ara h 1 - N.

III.2.2. Effet des traitements thermiques sur la capacité de dégranulation de cellules effectrices sensibilisées par les IgE de patients allergiques

Nous avons ensuite cherché à savoir si la perte d'immunoréactivité de Ara h 1 observée après chauffage se traduisait par une diminution du potentiel de dégranulation de cet allergène. L'effet du chauffage en présence ou non de glucose et du grillage dans la graine d'arachide sur le potentiel de dégranulation de Ara h 1 a ainsi été étudié dans le test de dégranulation mastocytaire développé au cours de ma thèse. Les sérums qui ont été utilisés pour sensibiliser les cellules sont 5 sérums collectés lors du programme Allergest (sérums

2205, 2207, 2209, 2304, 2305) et le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide. A titre d'exemple, les courbes de dégranulation obtenues pour le sérum 2305 et le pool de 76 sera de patients allergiques à l'arachide sont représentés figure 44.

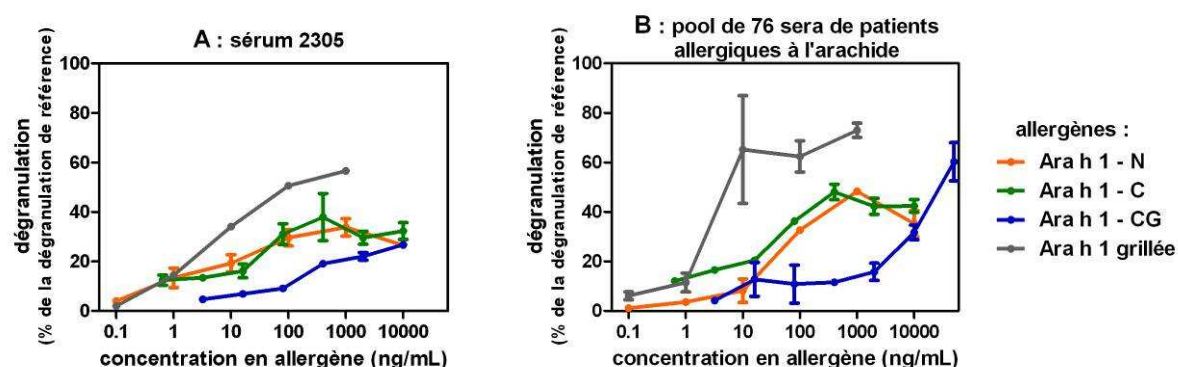


Figure 44 : Dégranulation de cellules RBL SX-38 sensibilisées par le sérum 2305 (A) et le pool de 76 sérums de patients allergiques à l'arachide (B), puis activées par les différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée).

Des dégranulations significatives sont induites par les différentes préparations de Ara h 1. Les résultats des dégranulations obtenues pour tous les sérums testés, puis activées par Ara h 1 - N, - C, - CG et grillée sont exprimés par les deux paramètres MaxD et EC50 dont les valeurs sont regroupées dans le tableau 28.

Tableau 28 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL SX-38 induites par Ara h 1 - N, - C, - CG ou grillée

Sérums	Ara h 1 - N		Ara h 1 - C		Ara h 1 - CG		Ara h 1 grillée	
	MaxD (%)	EC50 (ng/mL)	MaxD (%)	EC50 (ng/mL)	MaxD (%)	EC50 (ng/mL)	MaxD (%)	EC50 (ng/mL)
2205	23	170	18	25	20	195	57	0,6
2207	10	11	13	41	22	18000	61	2,6
2209	26	4	24	183	23	12000	37	2,8
2304	80	0,7	71	<0,5	73	103	104	0,6
2305	32	4,5	34	13	32	480	55	6
pool	42	35	44	20	65	11000	72	3

Les MaxD sont exprimés en pourcentage de la dégranulation de référence obtenue avec l'anticorps anti-IgE humaines. Les EC50 sont exprimées en ng/mL.

Ara h 1 - N, - C et - CG n'induisent pas, pour chaque sérum de fortes différences dans l'intensité des maxima de dégranulation. Pour tous les sérums, l'Ara h 1 grillée induit des

intensités de dégranulation plus fortes que celles obtenues avec les autres formes de Ara h 1. Nous avons montré dans la première partie que, pour les allergènes de l'arachide, l'intensité de la dégranulation était corrélée au taux d'IgE spécifiques vs IgE totales dans les sérums (paragraphe III.2.2.2.a). Les différences d'intensités de dégranulation observées reflètent donc une meilleure sensibilisation des sérums à Ara h 1 grillée comparée à Ara h 1 - N, - C ou - CG, ce que nous avons constaté lors du dosage en IgE spécifiques dans les sérums par EAST (paragraphe III.2.1.1).

Au sein d'un sérum, les doses d'EC50 estimées pour les différentes formes de Ara h 1 présentent de fortes disparités. La dégranulation est initiée par des doses beaucoup plus faibles de Ara h 1 grillée que de Ara h 1 crue. Cette observation est particulièrement significative après comparaison des EC50 pour certains sérums. Ainsi pour 3 sérums, il faut 4 à 280 fois plus de Ara h 1 crue que de Ara h 1 grillée pour atteindre l'EC50. Pour les 3 autres sérums, les EC50 sont équivalentes pour Ara h 1 - N et Ara h 1 grillée.

Les valeurs d'EC50 pour Ara h 1 - C sont plus fortes que celles observées pour Ara h 1 - N pour 3 sérums (2207, 2209 et 2305) avec des différences d'un facteur 3 à 45. Pour les autres sérums, les EC50 sont équivalentes sauf pour le sérum 2205. Les valeurs d'EC50 les plus fortes sont observées avec Ara h 1 - CG pour tous les sérums, avec des différences par rapport à Ara h 1 - C d'un facteur 8 à 550.

Notons que pour les sérums considérés individuellement, les données obtenues dans ce test cellulaire ne sont pas corrélées avec celles obtenues dans les tests de capacité de liaison aux IgE des mêmes patients (tableau 27).

Nous observons que Ara h 1 grillée a un meilleur potentiel de dégranulation que Ara h 1 - N dans ce test cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Le chauffage seul de Ara h 1 n'entraîne pas forcément une diminution de son potentiel de dégranulation, par contre le chauffage en présence de glucose entraîne une importante diminution de ce potentiel.

Pour la majorité des patients impliqués dans notre étude, nous pouvons supposer que la sensibilisation est le fait de la consommation d'arachide grillée. Il est donc logique que les IgE spécifiques anti-Ara h 1 reconnaissent préférentiellement Ara h 1 grillée vs Ara h 1 - N. Cependant, le chauffage en solution avec ou sans glucose n'améliore pas la reconnaissance de Ara h 1 - N, au contraire elle la diminue. Ces observations laissent donc supposer que les

changements structuraux de Ara h 1 diffèrent lors du traitement thermique dans la graine vs en solution, conduisant aux différences d'allergénicité observées. Ces points vont être étudiés plus finement grâce à l'utilisation du modèle animal de déclenchement de la réaction allergique chez la souris.

III.2.3. Effet des traitements thermiques sur le potentiel de déclenchement de la réaction allergique chez des souris sensibilisées expérimentalement

La capacité de déclenchement de la réaction allergique a été évaluée *in vivo*, dans un modèle de souris BALB/c décrit par Adel-Patient et coll. [261].

Le but de ce modèle animal est de discriminer l'activité biologique (c'est-à-dire le potentiel de déclenchement) de l'Ara h 1 - N vs Ara h 1 modifié (- C et - CG). Pour cela, les souris ont été sensibilisées soit par Ara h 1 - N adsorbé sur de l'alum, soit émulsionné en AIF. Ces différents adjuvants entraînent la production d'IgE spécifiques reconnaissant respectivement une protéine native ou dénaturée [261]. La sensibilisation avec ces deux adjuvants s'avère donc pertinente pour déterminer l'importance de la structure de Ara h 1 sur son potentiel de déclenchement de la réaction allergique.

III.2.3.1. Evaluation de la sensibilisation des souris

III.2.3.1.a. Dosages des IgE, IgG1 et IgG2a induites

L'induction des IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de l'Ara h 1 a été évaluée par EAST sur des plaques revêtues par Ara h 1 - N à partir des sérums collectés avant la provocation. Les souris ont été au préalable réparties de façon aléatoire en différents lots de provocation. Le dosage des anticorps spécifiques permettra donc de confirmer la sensibilisation des souris, et de s'assurer que les sensibilisations sont homogènes entre ces différents lots.

Comme démontré figure 45, des IgE spécifiques de Ara h 1 ont été induites significativement et de façon équivalente chez les souris sensibilisées en AIF ou en alum. Aucune différence entre les différents lots de provocation n'a pu être mise en évidence, démontrant l'homogénéité des lots constitués (non montré).

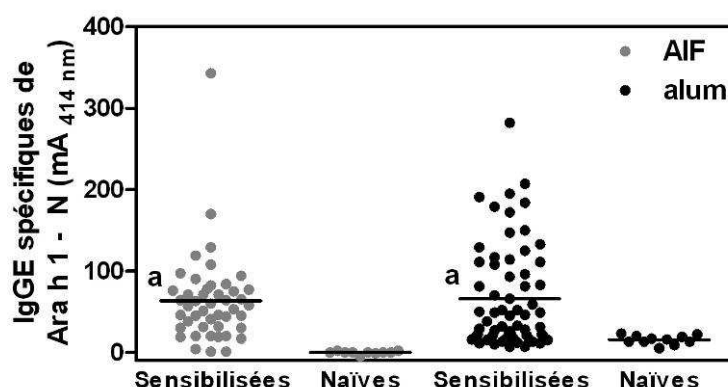


Figure 45 : Dosage des IgE spécifiques de Ara h 1 - N des souris sensibilisées en AIF et en alum

a indique une différence significative avec les autres groupes ($p < 0,05$ par analyse de variance et test de Tukey).

Des IgG1 spécifiques de Ara h 1 - N ont également été fortement induites chez les souris sensibilisées en alum, et plus modérément chez les souris sensibilisées en AIF (figure 46), confirmant la sensibilisation des souris. Des IgG2a spécifiques de Ara h 1 - N ont été également induites, de façon équivalente chez les souris sensibilisées en AIF ou en alum, démontrant l'induction conjointe d'une réponse Th1. Précisons que les dosages des IgG1 et les IgG2a sont réalisés respectivement au 1/100000 et 1/1000, démontrant l'induction préférentielle d'IgG1.

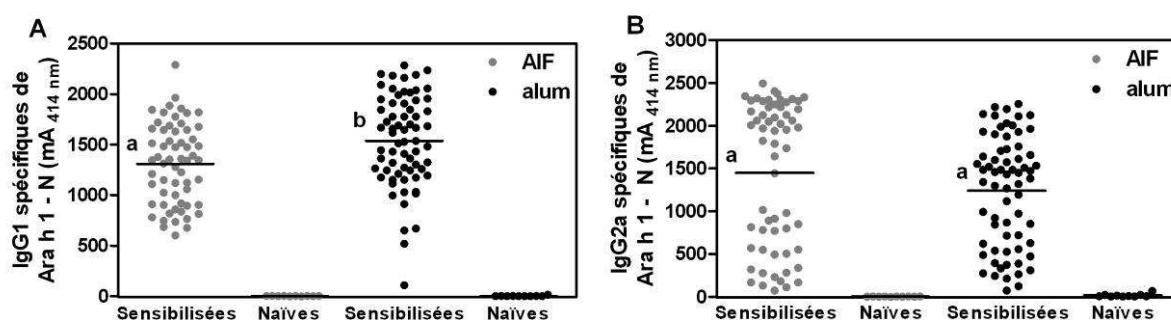


Figure 46 : Dosage des IgG1 (A, sérums dilués au 1/100000) et IgG2a (B, sérums dilués au 1/1000) spécifiques de Ara h 1 - N des souris sensibilisées en AIF et en alum

(a et b indiquent des différences significatives avec les autres groupes ($p < 0,05$ Anova et test de Tukey)).

Des IgE et IgG1 spécifiques de Ara h 1 - N sont donc induites après immunisation en alum ou en AIF, démontrant l'efficacité de la sensibilisation expérimentale chez ces souris. Les IgG2a reflètent l'induction concomitante d'une réponse Th1, ce qui est fréquemment décrit lors de ce type d'immunisation.

Cependant, différents biais peuvent intervenir dans ce type de dosage. Outre les modifications déjà évoquées induites par immobilisation de la protéine, la présence de fortes concentrations d'IgG1 spécifiques dans les sérums peut empêcher la fixation des IgE sur la phase solide et leur détection. Les interférences avec les IgG peuvent donc entraîner une sous-estimation des concentrations en IgE par compétition lors de la liaison à l'allergène immobilisé [399]. Les IgE spécifiques de Ara h 1 - N ont donc été dosées également en capture des IgE, permettant de s'affranchir de ces phénomènes, ainsi qu'en EAST à l'aide sérums de souris préalablement déplétés en IgG par passage sur protéine G. Ces différents tests ont permis de confirmer qu'il n'y avait pas de différence entre les différents groupes considérés (non montré).

III.2.3.1.b. Dosages des cytokines Th1/Th2 sécrétées ex vivo

La sensibilisation des souris a été confirmée par le dosage des cytokines Th1/Th2 sécrétées par les splénocytes réactivés par Ara h 1 - N (l'allergène sensibilisant) ou par Ara h 1 - C et - CG. La réactivation a également été effectuée avec du PBS ou une protéine contrôle (ovalbumine) comme témoins négatifs, et la Concanavaline A comme témoin positif. Comme montré figure 47, la ré-stimulation par Ara h 1 - N des splénocytes des souris sensibilisées en AIF ou en alum a induit la sécrétion des cytokines spécifiques de la prolifération lymphocytaires (IL-2), et de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 et GM-CSF), comparé aux splénocytes des souris naïves. Les cytokines Th1 telles que l'IL-12 (non montré) et l'IFN- γ ont également été détectées, confirmant une légère induction concomitante de cellules Th1. D'une façon générale, les sécrétions de cytokines Th2 ont été légèrement plus élevées, et celles de cytokines Th1 légèrement plus faibles, pour les souris sensibilisées en alum comparé aux souris sensibilisées en AIF.

La ré-stimulation par Ara h 1 - C et - CG a donné des sécrétions de cytokines équivalentes et toutes deux inférieures à celles observées pour Ara h 1 - N.

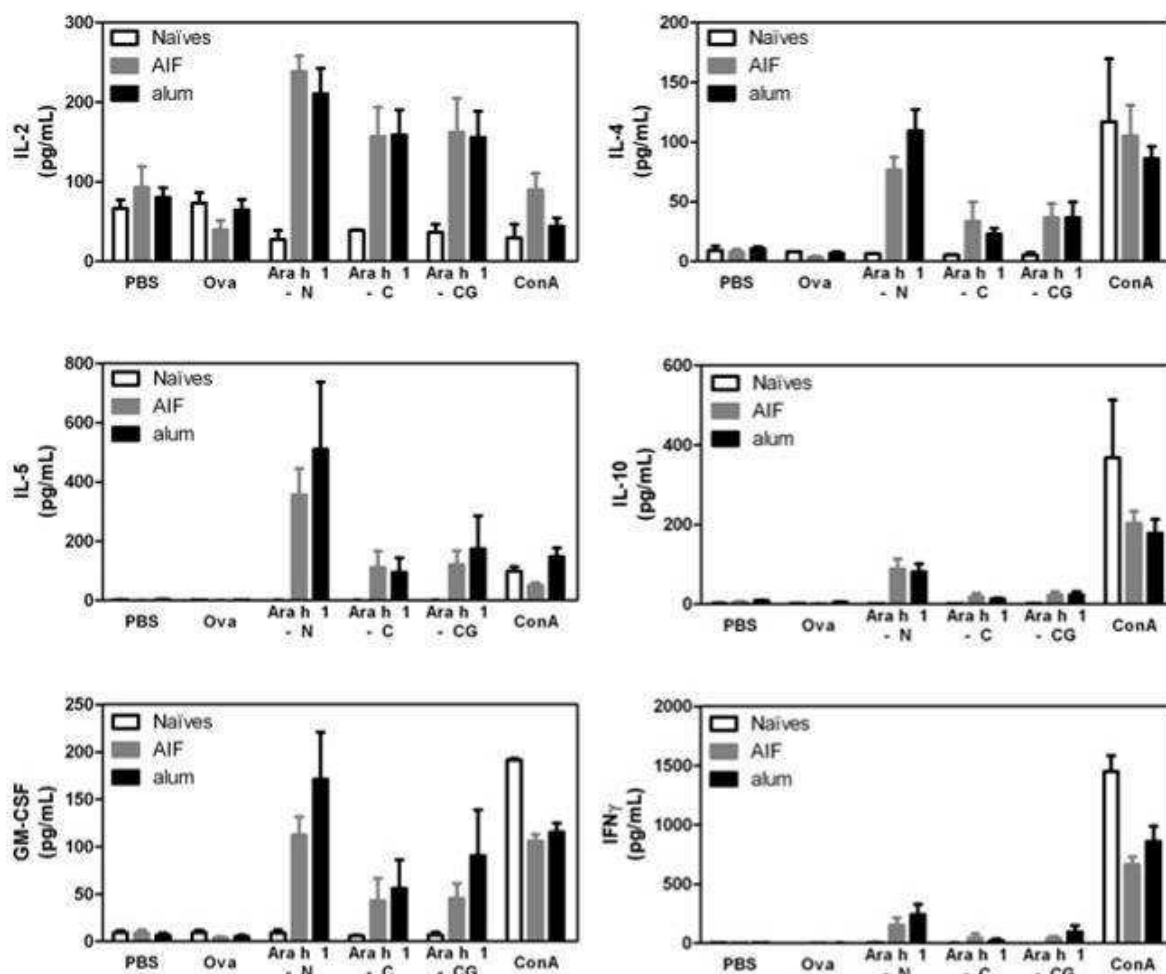


Figure 47 : Dosage des cytokines Th1/Th2 dans les surnageants des splénocytes réactivés de souris sensibilisées par Ara h 1 - N an AIF ou en alum ou de souris naïves.

III.2.3.2. Etude de la capacité de liaison des IgE spécifiques induites à Ara h 1 naturelle et modifiée

Dans un premier temps, afin d'évaluer la réactivité des IgE envers l'Ara h 1 - N, - C et - CG, et pour faire le parallèle avec les observations chez l'homme, des EAST ont été réalisés sur plaques revêtues de Ara h 1 - N, - C, ou - CG (figure 48).

Il est intéressant de noter que les IgE spécifiques induites suite à une sensibilisation par Ara h 1 - N reconnaissent également Ara h 1 - C et - CG. Cette reconnaissance semble équivalente à celle des IgE spécifiques de Ara h 1 - N quelque soit l'adjuvant considéré.

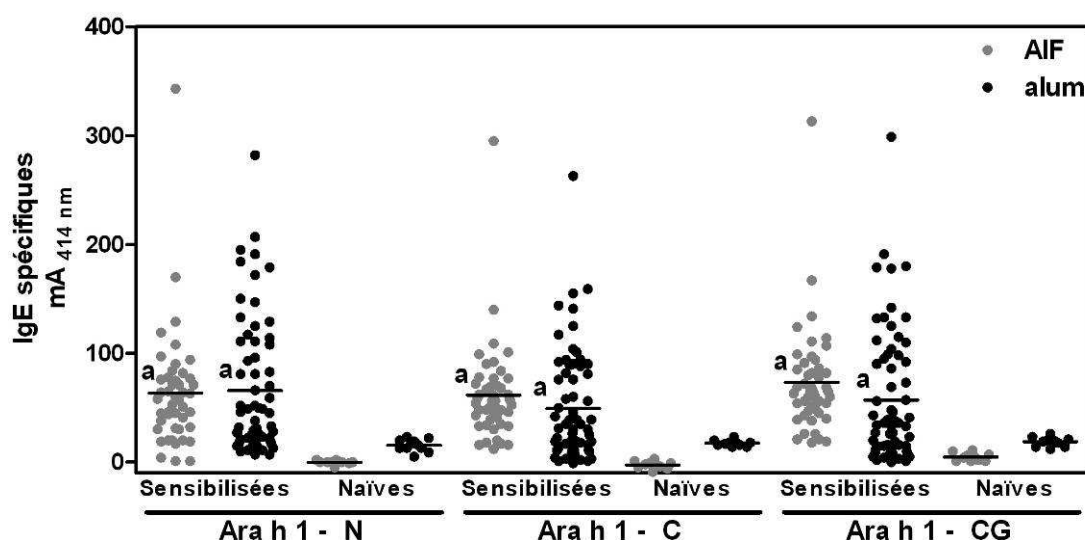


Figure 48 : IgE spécifiques de Ara h 1 - N, Ara h 1 - C et Ara h 1 - CG dans les sérums de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum évaluées par EAST (a indique des différences significatives avec les autres groupes ($p < 0,01$ par Anova et test de Tukey)).

Dans un second temps, des pools de sérums ont été réalisés pour chaque lot de sensibilisation, puis incubés sur plaques revêtues par un anti-IgE de souris (format capture d'IgE). Une compétition est alors réalisée entre un traceur Ara h 1 - N - G4 et les différentes protéines issues d'arachide crue (Ara h 1 - N, - C, - CG) ou d'arachide grillée (Ara h 1 grillée) (figure 49).

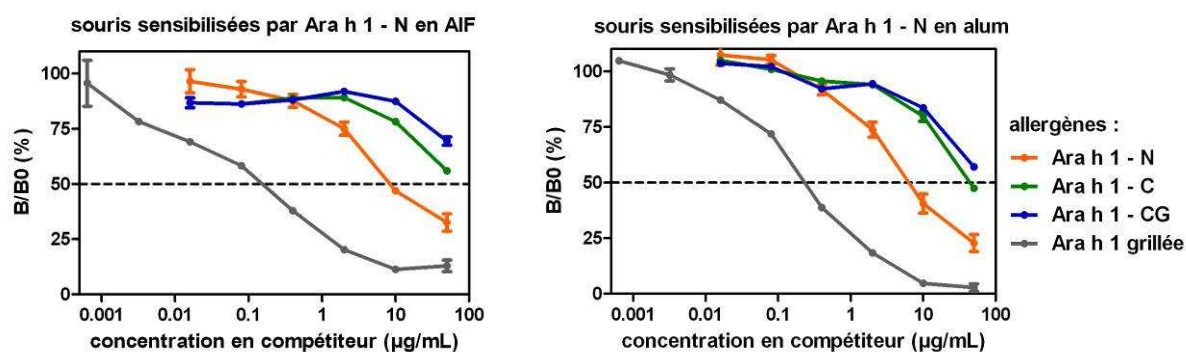


Figure 49 : Courbes d'inhibition de la liaison des IgE au traceur Ara h 1 - N - G4, obtenues pour les pools de sérums de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum.

Les courbes d'inhibition obtenues et les valeurs d'IC₅₀ calculées (tableau 29) montrent que le chauffage de Ara h 1 - N en solution entraîne une perte de son immunoréactivité chez les souris immunisées en AIF comme en alum : il faut 5 fois plus de

Ara h 1 - C que de Ara h 1 - N pour inhiber la liaison des IgE murines au traceur Ara h 1 - N - G4. Le chauffage de Ara h 1 en présence de glucose semble renforcer cette perte d'immunoréactivité, les valeurs d'IC₅₀ étant supérieures à 50 µg/mL avec Ara h 1 - CG en compétiteur. Ces tests montrent également que Ara h 1 grillée est plus immunoréactive que Ara h 1 - N (30 fois plus pour les souris immunisées en alum et 110 fois plus pour les souris immunisées en AIF) en dépit d'une sensibilisation à Ara h 1 - N.

Tableau 29 : IC₅₀ (µg/mL) obtenues en test de capture d'IgE avec Ara h 1 - N, - C et - CG et Ara h 1 grillée en compétiteurs pour les pools de sérums de souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF et en alum.

Immunisation des souris par Ara h 1 - N	IC ₅₀ (µg/mL) contre le traceur Ara h 1 - N - G4			
	Ara h 1 - N	Ara h 1 - C	Ara h 1 - CG	Ara h 1 grillée
en AIF	12	> 50	> 50	0,1
en alum	8	45	> 50	0,3

Ainsi, de façon intéressante, les souris immunisées par voie intra-péritonéale en alum ou en AIF par Ara h 1 - N produisent des IgE de spécificités aux différentes formes de Ara h 1 proches de celles observées chez les IgE de patients allergiques à l'arachide.

III.2.3.3. Tests de déclenchement *in vitro* à l'aide de sérums de souris sensibilisées expérimentalement

Des tests de dégranulation sur cellules RBL 2H3 (mastocytes de rat) ont été réalisés afin d'étudier le potentiel de dégranulation des différentes préparations de Ara h 1 à l'aide des IgE des sérums de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en Alum ou en AIF (figure 50).

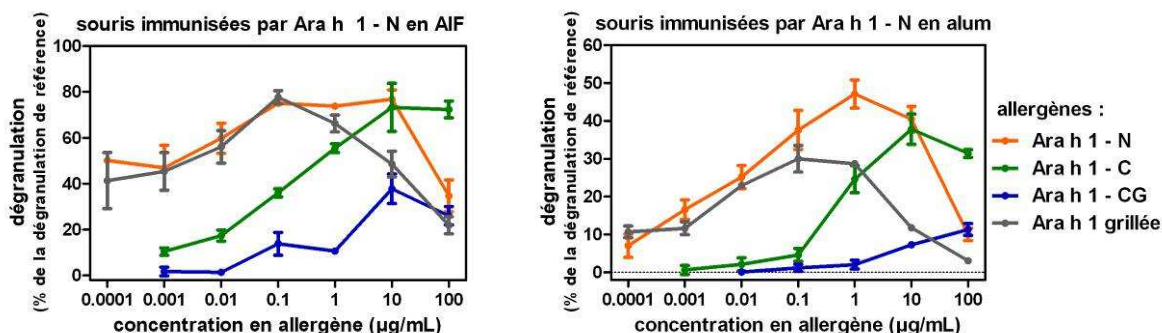


Figure 50 : Dégranulation de cellules RBL 2H3 sensibilisées par le pool de sérums de souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF (à gauche) et en alum (à droite), puis activées par les différentes préparations de Ara h 1 (- N, - C, - CG ou grillée).

Les courbes de dégranulation et les valeurs d'IC50 (tableau 30) obtenues montrent que, globalement, les intensités de dégranulations sont plus importantes pour les IgE de souris sensibilisées en AIF. Pour les IgE induites par la sensibilisation en AIF, Ara h 1 - N et Ara h 1 grillée montrent un potentiel de dégranulation similaire. L'Ara h 1 - grillée induit des dégranulations d'une intensité plus faible que Ara h 1 - N lors de l'utilisation des sérums de souris sensibilisées en alum. Dans ce test de déclenchement de la réaction allergique *in vitro*, quelque soit les sérums utilisés pour sensibiliser les cellules, le chauffage en solution entraîne clairement une diminution du potentiel de dégranulation de Ara h 1 qui est accentuée par la présence de glucose (tableau 30).

Tableau 30 : Modélisation (valeurs de MaxD et EC50) des dégranulations de cellules RBL 2H3 induites par Ara h 1 - N, - C, - CG ou grillée

pool de souris sensibilisées par Ara h 1 - N	Ara h 1 - N		Ara h 1 - C		Ara h 1 - CG		Ara h 1 grillée	
	Max (%)	EC50 (ng/mL)	Max (%)	EC50 (ng/mL)	Max (%)	EC50 (ng/mL)	Max (%)	EC50 (ng/mL)
en AIF	68	< 0,1	71	195	41	2130	62	< 0,1
en alum	45	7,5	35	470	12	6280	29	1,8

Les MaxD sont exprimés en pourcentage de la dégranulation de référence obtenue avec l'anticorps anti-IgE murines. Les EC50 sont exprimées en ng/mL.

Les valeurs d'EC50 obtenues dans ce test cellulaire de dégranulation de mastocytes pour des souris sensibilisées expérimentalement montrent des résultats légèrement différents de ceux obtenus à l'aide des sérums humains (paragraphe III.2.2). Les activations par Ara h 1 - N et Ara h 1 grillée sont équivalentes pour les sérums de souris alors que Ara h 1 grillée induisait des dégranulations pour des doses plus faibles que Ara h 1 - N pour les sérums humains. Les dégranulations par Ara h 1 - C ont un potentiel de dégranulation plus faible que Ara h 1 - N pour les sérums des souris sensibilisées expérimentalement alors que pour les sérums humains, leur potentiel de dégranulation est souvent similaire. Par contre, pour les sérums humains comme pour les sérums de souris sensibilisées expérimentalement, Ara h 1 - CG a un potentiel de dégranulation très réduit comparé aux autres préparations de Ara h 1.

III.2.3.4. Induction du déclenchement de la réaction allergique *in vivo*

III.2.3.4.a. Analyse des marqueurs précoces de la réaction allergique

Les LTC₄, LTE₄ et PGD₂ ont été dosés dans les LBA collectés 10 min après un test de provocation i.t. des souris sensibilisées par Ara h 1 - N, - C ou - CG, ou avec la solution saline (contrôle négatif). Les souris naïves provoquées par Ara h 1 (quelles que soient les modifications) n'ont pas démontré de libération de médiateur significative (non montré), tout comme les souris naïves et non provoquées (figure 51). Aucune production de PGD₂ n'est induite chez les souris, quel que soit le mode de sensibilisation et l'allergène utilisé pour la provocation. A l'inverse, l'Ara h 1 - N induit une production significative de LTC₄ et de LTE₄, à la fois chez les souris sensibilisées en AIF et en alum, en comparaison avec les souris des autres groupes (figure 51). Il est intéressant de noter que les libérations de leucotriènes sont significativement plus fortes chez les souris immunisées en alum comparées à celles obtenues chez les souris immunisées en AIF. Si l'on considère la sensibilisation en AIF, ni Ara h 1 - C, ni Ara h 1 - CG ne sont capables d'induire une production significative de leucotriènes. A l'opposé, Ara h 1 - CG (mais pas Ara h 1 - C) induit une production significative de leucotriènes chez les souris sensibilisées en alum, comparé aux souris provoquées par la solution saline ou aux souris naïves.

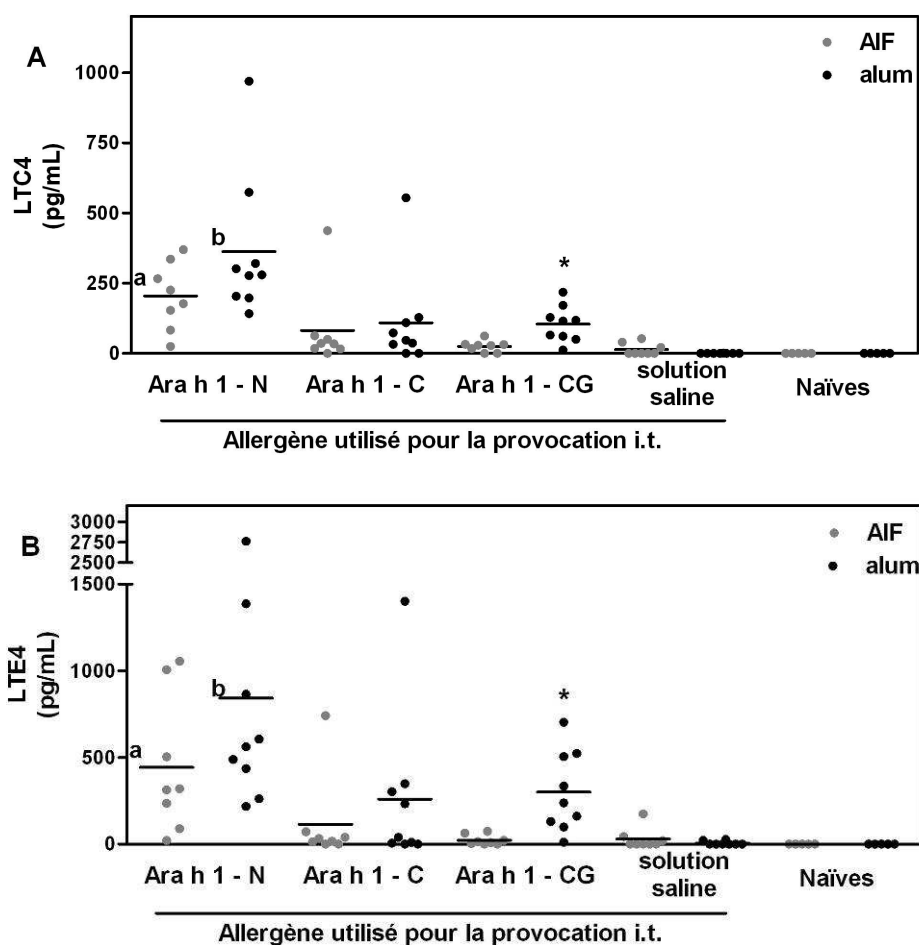


Figure 51 : Production de leucotriènes LTC4 (A) et LTE4 (B) dans les LBA des souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum

(a et b indiquent des différences significatives avec les autres groupes ($p < 0,05$ par Anova et test de Tukey) et * indique une différence avec les groupes témoins (provocation avec la solution saline et souris naïves) par test t ($p < 0,05$)).

III.2.3.4.b. Analyse des marqueurs de la réaction tardive

Les cytokines Th1/Th2 ont été dosées dans les LBA collectés 24 h après un test de provocation i.n. des souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum. Aucune sécrétion significative de cytokine n'a pu être détectée chez les souris naïves provoquées avec les différentes solutions (Ara h 1 - N, - C, - CG et la solution saline) (non montré). L'IFN- γ et le TNF- α n'ont pas été détectés dans les LBA des souris immunisées en AIF ou en alum et provoquées par les différentes solutions (non montré). Les résultats concernant l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-12 et le GM-CSF sont rapportés figure 52.

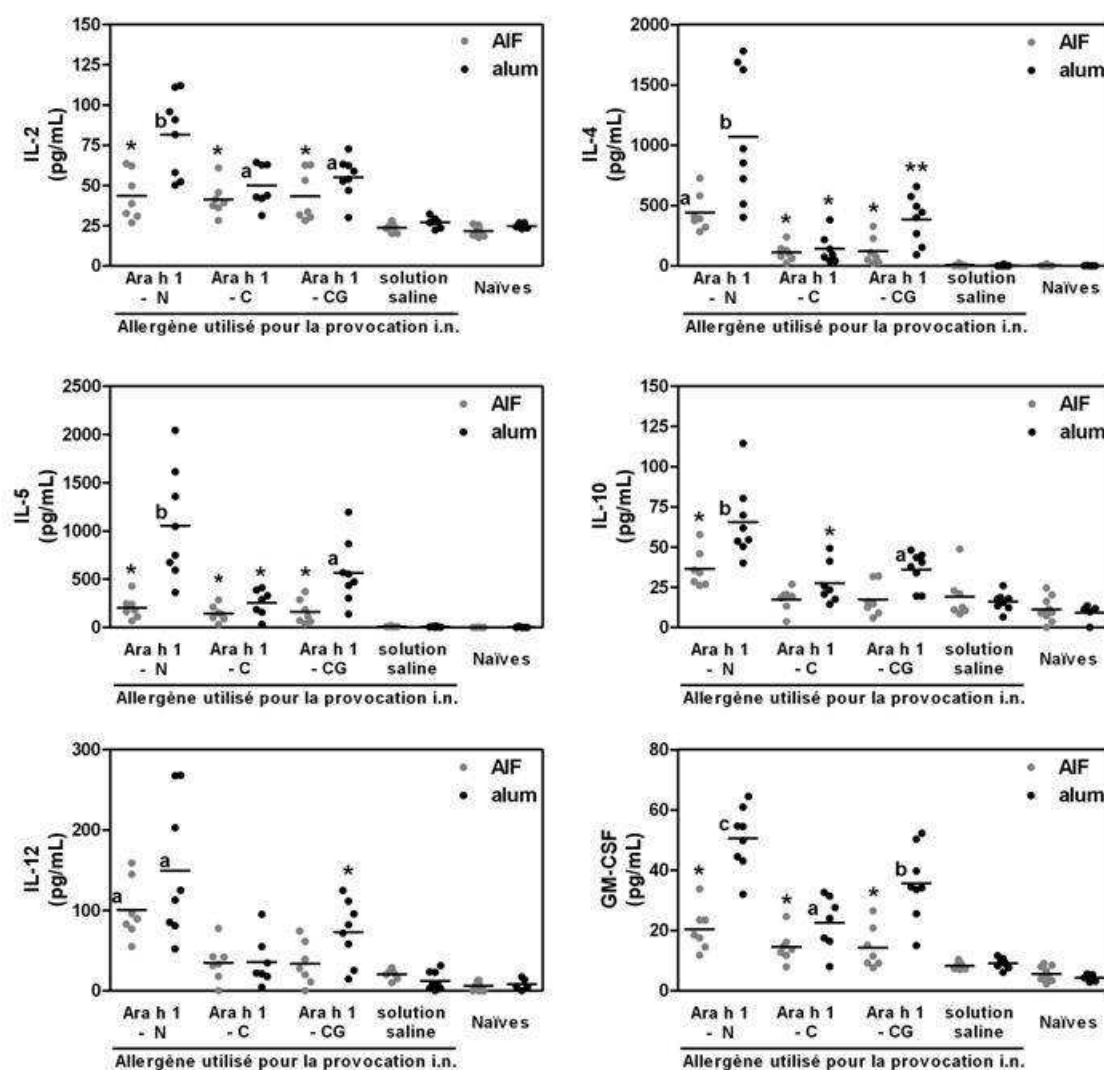


Figure 52 : Production de cytokines 24 h après la provocation i.n. de souris sensibilisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum ou chez des souris naïves

(a, b et c indiquent des différences significatives avec les autres groupes ($p < 0,05$ par Anova et test de Tukey) et * indique une différence avec les groupes témoins (provocation avec la solution saline et souris naïves) par test t ($p < 0,05$)).

Chez les souris immunisées par Ara h 1 - N en AIF ou en alum et provoquées par Ara h 1 - N, l'IL-12 a été sécrétée de façon équivalente. A l'inverse, les productions locales d'IL-2, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et de GM-CSF ont été significativement plus élevées chez les souris sensibilisées en alum que chez les souris sensibilisées en AIF.

Les différences de production de cytokines dans les LBA ont été également analysées selon l'adjuvant utilisé pour la sensibilisation des souris. Pour l'AIF, nous observons une sécrétion équivalente d'IL-2, d'IL-5 et de GM-CSF après les provocations par Ara h 1 - N, - C et - CG, sécrétions qui sont significativement différentes de celles observées pour les souris

témoin (souris sensibilisées et provoquées par la solution saline et souris naïves). A l'inverse, la sécrétion d'IL-4 est significativement plus forte pour les souris provoquées par Ara h 1 -N que par les souris provoquées par Ara h 1 - C et - CG, même si la sécrétion d'IL-4 reste significative pour Ara h 1 - C et - CG. Enfin, les sécrétions d'IL-10 et d'IL-12 ne sont significatives qu'après la provocation par Ara h 1 - N. Les observations sont différentes chez les souris sensibilisées par Ara h 1 - N en alum. L'IL-2 a été significativement induite et de façon équivalente après les provocations par Ara h 1 - C et - CG. Cette sécrétion a cependant été plus faible comparée à celle observée après la provocation par Ara h 1 - N. Pour les autres cytokines, les sécrétions observées suite aux provocations par Ara h 1 - C et - CG ont été significativement plus faibles que celles observées pour Ara h 1 - N. Des différences peuvent être observées entre les provocations par Ara h 1 - C et - CG concernant les sécrétions d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10, d'IL-12 et de GM-CSF, pour lesquelles Ara h 1 - CG est plus réactif.

Nous avons ensuite analysé l'influx d'éosinophiles et de neutrophiles dans les LBA collectés 24 h après la provocation par les différentes formes de Ara h 1, ces influx étant des marqueurs de la phase tardive de la réaction allergique, corrélant avec la sécrétion de cytokines de type Th2 [261] (figure 53).

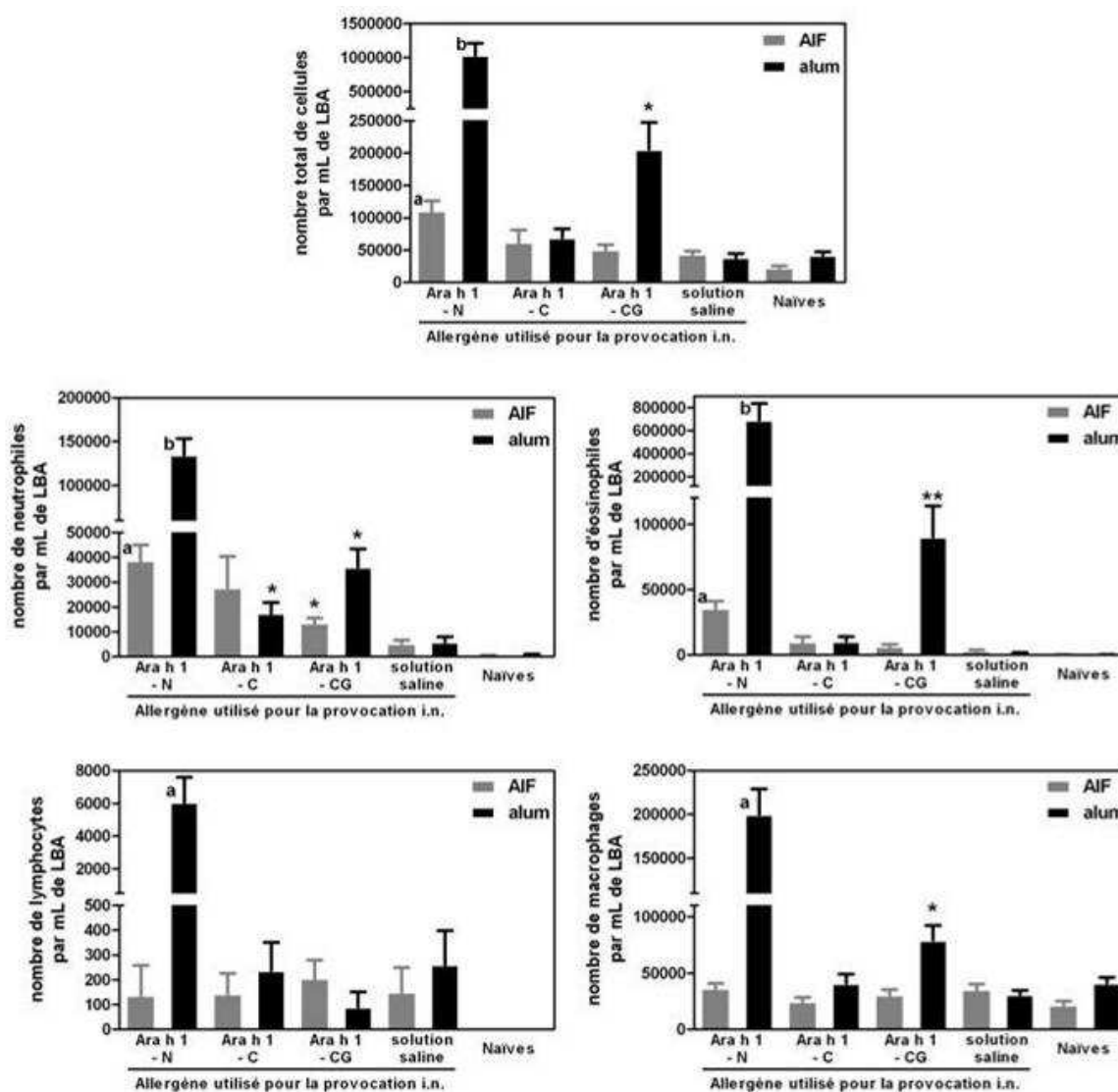


Figure 53 : Nombre de cellules totales, d'éosinophiles, de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages dans les LBA des souris sensibilisées avec Ara h 1 - N en AIF ou en alum et provoquées par l'Ara h 1 - N, - C, - CG ou une solution saline
(a indique une différence significative avec les autres groupes ($p < 0,05$ par Anova et test de Tukey) et * et ** indiquent des différences des groupes entre eux et avec les groupes témoins (provocation avec la solution saline et souris naïves) par test t ($p < 0,05$)).

Après provocation par Ara h 1 - N, le nombre total de cellules est significativement augmenté dans les deux lots de sensibilisation. Cette augmentation est néanmoins plus intense chez les souris sensibilisées en alum. Cette augmentation est la résultante d'un influx d'éosinophiles et de neutrophiles, influx significativement plus important chez les souris sensibilisées en alum que chez les souris sensibilisées en AIF. Chez les souris sensibilisées en AIF provoquées par Ara h 1 - C et - CG, les influx d'éosinophiles et de neutrophiles sont diminués par rapport à ce qui est observé après la provocation par Ara h 1 - N, voire non

significatifs comparés aux témoins négatifs. Chez les souris sensibilisées en alum, les nombres d'éosinophiles et de neutrophiles dans les LBA démontrent un influx important de ces types cellulaires après provocation par Ara h 1 - CG, mais pas après provocation par Ara h 1 - C.

Le nombre de lymphocytes est par ailleurs significativement augmenté suite au test de provocation par Ara h 1 - N chez les souris sensibilisées en alum. Le nombre de macrophages est également fortement augmenté chez ces souris, ainsi que suite à la provocation par Ara h 1 - CG.

III.2.3.5. Conclusions

L'utilisation des deux adjuvants AIF et alum pour l'immunisation par Ara h 1 a conduit à une sensibilisation équivalente des souris, tant au point de vue de la production d'IgE (et d'IgG1) spécifiques de Ara h 1 - N que de la production de cytokines Th2.

L'analyse de la spécificité des IgE induites dans les deux lots de souris a permis de montrer que le chauffage de Ara h 1 en solution entraîne une perte de son immunoréactivité. Cette perte d'immunoréactivité est encore plus importante quand le chauffage est réalisé en présence de glucose. Cependant, dans les deux lots de souris sensibilisées, la réactivité des IgE est plus forte envers Ara h 1 issue d'arachide grillée, corroborant les tests de liaison avec les IgE humaines. Ainsi, les spécificités des IgE de souris et celles des IgE humaines sont similaires malgré des voies et des modes de sensibilisations différents.

Par ailleurs, les tests de dégranulation sur les cellules RBL 2H3 sensibilisées par les IgE de souris montrent une fonctionnalité équivalente de Ara h 1 - N et Ara h 1 grillée, tandis que le potentiel de dégranulation est fortement diminué après chauffage en solution, en présence ou non de glucose. Dans les tests cellulaires sur cellules RBL SX-38 avec des sérums humains, nous avons observé que le potentiel de dégranulation de Ara h 1 - C est identique ou légèrement inférieur à celui de Ara h 1 - N. Après chauffage en présence de glucose, ce potentiel est, comme chez la souris, très fortement diminué.

Les résultats de déclenchement *in vitro* obtenus avec la souris sont donc comparables à ceux observés après utilisation d'IgE humaines dans le modèle cellulaire RBL SX-38 pour Ara h 1 - N et Ara h 1 - CG.

L'étude de la phase de déclenchement de la réaction allergique, avec le modèle souris révèle une forte diminution du potentiel de déclenchement par Ara h 1 après chauffage de l'allergène en solution. A l'inverse de ce qui est observé pour la réactivité des IgE (tests de liaison des IgE et déclenchement *in vitro*), il s'avère que la présence de glucose modère partiellement cette perte de réactivité biologique, notamment chez les souris sensibilisées en alum. L'alum induit la production d'IgE spécifiques d'une forme native de la protéine, tandis que l'AIF favorise la production d'IgE spécifiques d'une forme dénaturée de Ara h 1. Nos résultats suggèrent donc que le chauffage de Ara h 1 en solution seule entraîne une dénaturation de Ara h 1, et par conséquent une perte de sa réactivité *in vitro* et *in vivo* dans les deux lots de sensibilisation. Par contre, la présence de glucose pourrait protéger Ara h 1 de la dénaturation thermique, et par conséquent atténuer la perte de potentiel de déclenchement de la réaction allergique. L'importance de la structure partiellement conservée de Ara h 1 - CG s'exprime ainsi uniquement chez les souris sensibilisées en alum. Il reste cependant surprenant que les souris sensibilisées en AIF développent très peu de réaction allergique suite à des tests de provocation par Ara h 1 - C ou - CG, notamment si l'on considère que ces protéines sont partiellement dénaturées. La dénaturation par l'émulsion en AIF et par la chaleur induirait donc des modifications structurales et la perte ou le masquage d'épitopes. Bien que des tests *in vivo* de déclenchement par Ara h 1 grillée n'aient pas été réalisés chez la souris, les tests de liaison aux IgE et de dégranulation *in vitro* suggèrent une forte réactivité de cette protéine, dépendant là encore de sa structure et de sa présentation.

L'ensemble de ces travaux démontre la perte d'immunoréactivité et de fonctionnalité biologique de Ara h 1 par un chauffage en solution, en présence ou non de glucose. Cette réactivité est très inférieure à celle observée pour Ara h 1 issue d'arachide grillée.

IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Le mode de consommation de l'arachide est un élément important dans l'allergénicité de cet aliment. Aux Etats-Unis, l'allergie à l'arachide a une prévalence forte alors que c'est une allergie assez rare en Chine. La différence de prévalence de l'allergie à l'arachide entre les Etats-Unis et la Chine trouverait son explication dans le traitement thermique appliqué avant consommation : l'arachide est consommée bouillie ou frite en Chine alors qu'aux Etats-Unis, elle est consommée grillée à sec [313]. Cette augmentation de l'allergénicité de l'arachide serait due à la formation de produits de la réaction de Maillard, ainsi qu'au démasquage d'épitopes lors du grillage [282;314]. A l'inverse, le fait de bouillir l'arachide conduirait à une moindre allergénicité de la graine du fait de la fuite d'allergènes dans l'eau de cuisson et d'une modification de structure des allergènes différente de celle observée lors du grillage [315]. La population étudiée lors de nos travaux concerne essentiellement des consommateurs français, autrichiens et néerlandais qui consomment l'arachide grillée.

L'influence des traitements thermiques sur la réactivité de Ara h 1 a été jusqu'à maintenant analysée uniquement à partir de tests de liaison aux IgE. Maleki et coll. ont ainsi montré que Ara h 1 issue d'arachide grillée a une capacité de liaison aux IgE d'un pool de patients allergiques 90 fois supérieure à celle de Ara h 1 issue d'arachide crue [310]. Mondoulet et coll. ont également décrit que l'immunoréactivité des IgE des allergènes purifiés Ara h 1 issue de l'arachide grillée est plus élevée que celle de Ara h 1 issue de l'arachide crue [315]. Nos résultats de tests de liaison aux IgE confirment l'immunoréactivité plus forte de Ara h 1 issue d'arachide grillée que de celle de Ara h 1 issue d'arachide crue (Ara h 1 - N).

Maleki et coll. avaient étudié l'allergénicité de Ara h 1 après génération de produits de la réaction de Maillard *in vitro* (chauffage à 55°C pendant 10 jours en présence de différents sucres). Après ce traitement, Ara h 1 présente une meilleure capacité de liaison aux IgE d'un pool de sérums de patients allergiques à l'arachide, avec une valeur d'IC₅₀ 4,4 fois moindre que pour Ara h 1 chauffée sans glucose [310]. Nous avons réalisé une expérience similaire en chauffant Ara h 1 (pendant 15 min à 100°C) en présence ou non de glucose. Nous avons alors observé que le chauffage de Ara h 1 en présence de glucose entraîne une perte importante de son immunoréactivité pour tous les sérums testés tandis que le chauffage sans glucose entraîne une perte de son immunoréactivité pour les 2/3 des sérums. Pour le tiers restant, son

immunoréactivité demeure inchangée. Ces résultats semblent donc en contradiction avec ceux de Maleki et coll. Cependant, les protocoles de chauffage utilisés sont différents et ne conduisent certainement pas aux mêmes modifications de structure de Ara h 1. Notre protocole de chauffage en présence de glucose conduirait notamment à la formation d'agrégats, ce qui n'est pas décrit par Maleki et coll. Les caractérisations biochimiques et physiques de Ara h 1 - N *versus* - C et - CG sont en cours de réalisation à l'IFR, et devrait permettre d'expliquer ces divergences de résultats.

Nous avons par ailleurs analysé l'effet des traitements thermiques sur la capacité à déclencher la réaction allergique sur des cellules RBL SX-38 sensibilisées à l'aide des mêmes sérums que ceux utilisés en tests de liaison des IgE. Nous avons alors observé que Ara h 1 purifiée à partir d'arachide grillée est la plus efficace dans l'induction de la dégranulation *in vitro*. Le potentiel de dégranulation de Ara h 1 chauffée en solution reste inchangé ou est légèrement diminué, selon les sérums, comparé à celui de Ara h 1 purifiée à partir d'arachide crue. Par contre, ce potentiel est fortement diminué lors du chauffage en présence de glucose. Ces résultats corroborent donc les observations obtenues en tests de liaison des IgE.

Nous avons réalisé des tests de déclenchement *in vivo* chez la souris expérimentalement sensibilisée à Ara h 1 - N. Ces souris produisent des IgE spécifiques qui, comme les IgE de patients allergiques, reconnaissent les différentes formes de Ara h 1. Ainsi, de façon surprenante, malgré une sensibilisation des souris par Ara h 1 - N en alum (favorisant l'induction d'IgE spécifiques de la forme native de la protéine), les IgE produites reconnaissent mieux Ara h 1 grillée que Ara h 1 - N. L'allergénicité de Ara h 1 grillée ne résulterait donc pas seulement d'une sensibilisation spécifique à Ara h 1 grillée, mais serait aussi liée à une meilleure accessibilité des épitopes au sein de Ara h 1 grillée.

Si l'on considère Ara h 1 - N et Ara h 1 - CG, les tests de dégranulation *in vitro* sont également comparables qu'ils soient réalisés avec des IgE provenant de patients allergiques ou des IgE de souris sensibilisées expérimentalement. Par contre, et de façon surprenante, le déclenchement *in vivo* de la réaction allergique chez la souris montre que la présence de glucose compense partiellement la perte de réactivité due au chauffage. Un environnement glucidique, sans forcément entraîner un couplage chimique, pourrait donc engendrer des présentations différentes des épitopes de Ara h 1.

La forte réactivité de Ara h 1 issue d'arachide grillée et le potentiel de déclenchement *in vivo* de Ara h 1 - CG démontrent clairement l'influence de l'environnement matriciel lors

du traitement thermique dans le potentiel déclenchant de Ara h 1. Des études ont démontré l'importance de la matrice alimentaire sur l'allergénicité des protéines de l'arachide. Lorsque l'arachide est ingérée avec une matrice lipidique, les doses-seuils des DBPCFC sont plus élevées. La matrice lipidique rendrait inaccessibles les épitopes des allergènes d'arachide et/ou la libération des allergènes serait plus lente et progressive [331]. Il a été également suggéré un effet adjuvant de la matrice de la graine de l'arachide dans un modèle animal, les allergènes purifiés possédant un pouvoir de stimulation du système immunitaire moindre qu'un extrait allergénique total [165]. D'autre part, la matrice alimentaire peut modifier la susceptibilité des protéines à la digestion. Celle-ci est ralentie en présence de polysaccharides [333]. Dans ce sens, les protéines du lait de vache sont digérées plus lentement quand elles sont dans le lait cru que quand elles sont sous forme de protéines purifiées [288]. De plus, il a été montré qu'une matrice lipidique et/ou une émulsion augmentent l'absorption gastrointestinale de l'allergène de soja Gly m Bd 30k chez des souris [332]. Un allergène devant en théorie atteindre le système immunitaire sous une forme immunologiquement active, ces facteurs sont importants pour déterminer le potentiel allergénique d'une protéine dans un aliment et la matrice alimentaire est donc à prendre en considération dans l'évaluation de l'allergénicité.

La complexité de l'évaluation de l'allergénicité des protéines est ici soulignée par des résultats parfois divergents entre études *in vitro* et *in vivo*. Ils soulignent donc la multiplicité des facteurs interagissant entre eux qui conduisent finalement au déclenchement de la réaction allergique. Bien que le modèle de déclenchement *in vitro* développé durant cette thèse ne reflète que partiellement un pouvoir déclenchant *in vivo*, il reste un outil précieux pour étudier finement l'effet de modifications structurales des allergènes sur leur capacité de lier et de ponter les IgE.

Les travaux effectués durant cette thèse ont permis de développer un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Les différentes applications réalisées démontrent que ce modèle est un outil pertinent pour l'étude de la fonctionnalité de l'interaction entre les IgE et les allergènes.

Une des ces applications est de pouvoir analyser **la fonctionnalité des allergènes purifiés**, c'est-à-dire leur capacité à induire un pontage des IgE entraînant une dégranulation. La fonctionnalité des allergènes purifiés de l'arachide puis des laits de vache et de chèvre a ainsi été confirmée. Les résultats obtenus à l'aide du modèle cellulaire viennent en complément des études réalisées sur la capacité de liaison des allergènes aux IgE de patients allergiques. Le test de dégranulation mastocytaire est désormais utilisé au laboratoire afin de caractériser et de valider les extraits protéiques et les protéines purifiées préparés à l'UIAA à partir des aliments (Blanc et al., sous presse) (annexe I, pageX). Ce type de test a servi de référence pour évaluer l'allergénicité de standards protéiques utilisés dans des tests de diagnostic [373].

Ce test cellulaire nous a également permis d'estimer les différences de **potentiel de dégranulation des allergènes purifiés de l'arachide et des laits de chèvre et de vache**. La définition de la dose activatrice (ou EC50, dose d'allergène induisant la moitié de la dégranulation maximale) a permis de « classer » ces différents allergènes selon leur potentiel de dégranulation. Dans le cas de l'allergie aux laits de vache et de chèvre, la fraction caséine entière a un potentiel de dégranulation plus fort que celui de la fraction lactosérum. L'hétérogénéité des réponses observées dans notre population ne nous a pas permis de mettre en évidence l'importance d'une fraction de caséine particulière, si ce n'est que la caséine κ a un plus faible potentiel de déclenchement que les autres caséines. Il est à noter que, pour les patients allergiques au lait de chèvre mais tolérant le lait de vache, les caséines bovines présentent un potentiel allergénique faible alors que de très faibles quantités de caséines caprines suffisent à induire une dégranulation des mastocytes. Ces résultats mériteraient d'être complétés par l'étude d'un nombre plus significatif de patients allergiques aux produits laitiers de chèvre.

Dans le cas des patients allergiques à l'arachide, la dégranulation des mastocytes est induite à des doses 30 à 50 fois plus faibles par les albumines 2S, Ara h 2 et Ara h 6, que par

les allergènes Ara h 1 et Ara h 3. (publication soumise à « Clinical and Experimental Allergy » (Annexe II)).

Les doses déclenchant des dégranulations significatives sont plus faibles pour les allergènes de l'arachide que pour ceux des laits de vache ou de chèvre. Ce test très sensible pourrait donc être utilisé afin d'estimer l'allergénicité liée à la présence d'arachide dans des aliments complexes.

Le modèle de dégranulation a également été adapté pour l'analyse de la relation entre la structure d'un allergène et son allergénicité

En effet, Ara h 6 est un allergène modèle pour différentes études menées au sein du laboratoire. Elle présente des structures conservées parmi les albumines 2S et stabilisées par de nombreux ponts disulfures. Notre test de dégranulation met en évidence une très forte perte du potentiel allergénique de Ara h 6 après sa dénaturation chimique par réduction complète des ponts disulfures. Ces résultats démontrent que la conformation de Ara h 6 est essentielle à son allergénicité. L'identification des structures responsables de cette allergénicité fait actuellement appel à une approche de biologie moléculaire, par mutagenèse dirigée. Différents mutants de Ara h 6 sont produits afin de réduire progressivement et de façon ciblée les différents ponts disulfures responsable de la conformation de cette protéine. La liaison de ces formes modifiées de Ara h 6 aux IgE de patients allergiques, ainsi que leurs pouvoirs déclenchants respectifs, seront analysés conjointement. A terme, le test de dégranulation permettra de caractériser l'effet des différents changements structuraux sur l'allergénicité de cette protéine.

L'utilisation de ce modèle cellulaire est également pertinente pour analyser l'effet des traitements thermiques, de la digestion et de la matrice alimentaire sur l'allergénicité des protéines de l'arachide

La digestion, les traitements thermiques et autres procédés industriels peuvent modifier la présence et la structure des protéines dans une matrice alimentaire, et donc avoir un impact sur leur allergénicité. A partir d'une population hétérogène de patients allergiques à l'arachide, nous avons appliqué notre modèle à l'étude de l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de la globuline 7S de l'arachide, Ara h 1. Nous avons ainsi montré que Ara h 1 issue d'arachide grillée présente une immunoréactivité et un potentiel de dégranulation

plus important que Ara h 1 issue d'arachide crue. Par contre le chauffage seul de Ara h 1 en milieux aqueux n'induit pas, ou peu, de modification de son potentiel de dégranulation. A l'inverse, la présence de glucose pendant le chauffage engendre une diminution forte de ce potentiel.

Nous avons complété ces études en étudiant le potentiel de déclenchement de la réaction allergique de ces différentes formes de Ara h 1, dans un modèle animal. Ces travaux montrent que le chauffage de Ara h 1 en solution entraîne une perte partielle, voire totale, de sa réactivité, tandis que la présence de glucose atténue cette perte, probablement en protégeant Ara h 1 de la dénaturation thermique. En parallèle de nos travaux, d'autres partenaires du programme Europrevall étudient l'effet de ces mêmes traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h 1 dans d'autres modèles expérimentaux. Le potentiel de sensibilisation des allergènes naturels/modifiés est étudié dans un modèle animal de rats BN par Stine Kroghsbo et le Dr Charlotte Madsen (National Food Institute, Department of Toxicology and Risk Assessment; Danemark). Yvonne Vissers et le Dr Harry Wichers étudient l'induction de la polarisation Th1/Th2 des lymphocytes chez les patients dont nous avons analysé les sérums (Université de Wageningen, Pays-Bas). Les études de l'effet de ces traitements sur l'allergénicité des albumines 2S (Ara h 2 et Ara h 6) doivent également être réalisées par les différents partenaires du programme européen. L'effet des digestions gastrique et duodénale sur l'allergénicité de Ara h 1 et Ara h 2/6 (naturel *versus* chauffé) doit également être analysé, ainsi que l'effet de l'inclusion des allergènes dans une matrice alimentaire.

La caractérisation des protéines, et notamment des modifications structurales engendrées par ces traitements, en cours de réalisation à l'IFR, permettra *in fine* de mieux comprendre la relation entre la structure et l'allergénicité d'une protéine. La confrontation de tous les résultats obtenus permettra de proposer une approche intégrative permettant de statuer quant à l'effet du chauffage, de la digestion et de l'inclusion dans une matrice alimentaire sur l'allergénicité de ces protéines modèles et d'évaluer l'importance relative des différents modèles considérés. Plus généralement, elle permettra de proposer de nouvelles stratégies pour évaluer l'allergénicité des aliments.

Le modèle cellulaire pourrait par ailleurs permettre **une meilleure compréhension des mécanismes de l'interaction IgE-allergène et de la dégranulation des mastocytes** qui en résulte.

Les résultats présentés dans cette thèse nous ont amené à considérer de nombreux facteurs pouvant intervenir dans la capacité de dégranulation des cellules. Nous n'avons pas montré d'influence des complexes IgE-IgG dans les sérums des patients allergiques à l'arachide étudiés. Cependant, il nous paraît important de prendre la mesure de l'existence de ces complexes dans les sérums. Il serait intéressant de mener des études comparatives sur la complexation des IgE dans les sérums de populations différentes : des patients allergiques à l'arachide, allergiques aux laits de vache et de chèvre, spécifiquement allergiques au lait de chèvre et non allergiques (tolérants). Un suivi longitudinal de patients serait également une bonne source d'information pour déterminer le rôle physiologique de ces complexes dans les sérums.

Les doses d'allergènes déclenchant une dégranulation sont très variables entre sérums et entre protéines. Nous avons par exemple observé que les allergènes de l'arachide avaient un potentiel de dégranulation plus fort que les allergènes des laits de vache et de chèvre. Nous avons également observé des différences entre allergènes purifiés d'un même aliment. L'ensemble de ces observations n'apparaît pas majoritairement lié à une quantité d'IgE spécifiques fixées sur les mastocytes. De plus, pour certains patients allergiques, une augmentation de la quantité de Ara h 6 engendrerait deux phases consécutives de dégranulation dans notre modèle. Un tel phénomène pourrait révéler la mobilisation successive de plusieurs populations d'IgE spécifiques d'affinités différentes. L'existence d'une réaction croisée entre les albumines 2S de l'arachide nous a amené à penser que les sérums présenteraient des IgE spécifiques de Ara h 2 qui auraient une affinité plus faible pour Ara h 6. D'une façon générale, l'affinité des IgE spécifiques doit influencer significativement les potentiels de dégranulation des différents allergènes testés. Il apparaît donc intéressant de développer des modèles d'étude permettant de caractériser l'affinité des IgE envers les différents allergènes. Nous sommes conscients que ces développements représentent un travail important et difficile à mettre en œuvre, mais nos résultats soulignent leur importance. L'affinité des IgE pour les allergènes pourrait en effet être un marqueur de la sévérité de la réaction allergique.

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM: **Physico-chemical properties of human reagin antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reagin activity.** *J.Immunol.* 1966, **97**:75-85.
2. Johansson SG, Bennich H: **Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin.** *Immunology.* 1967, **13**:381-394.
3. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD: **Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin.** *Immunology.* 1968, **15**:323-324.
4. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: **Allergie et hypersensibilité.** In *Immunobiologie*, edn 2ème édition française. De Boeck Université; 2003:472.
5. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van CP, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B: **A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.** *Allergy.* 2001, **56**:813-824.
6. Meyer P, Co Minh HB, Demoly P: **Révision de la nomenclature des termes en allergologie Revision of the nomenclature for allergic diseases.** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2003, **43**:278-280.
7. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C: **The prevalence of food allergy: a meta-analysis.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2007, **120**:638-646.
8. Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, Ehlers I, Worm M, Zuberbier T, Niggemann B: **Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents.** *Clin Exp.Allergy.* 2004, **34**:1534-1541.
9. Bock SA: **Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life.** *Pediatrics* 1987, **79**.
10. Venter C, Pereira B, Voigt K, Grundy J, Clayton CB, Higgins B, Arshad SH, Dean T: **Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life.** *Allergy.* 2008, **63**:354-359.
11. Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F: **Population study of food allergy in France.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2001, **108**:133-140.
12. Saarinen KM, Pelkonen AS, Makela MJ, Savilahti E: **Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2005, **116**:869-875.
13. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA: **The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2007, **120**:1172-1177.
14. Savage JH, Matsui EC, Skripak JM, Wood RA: **The natural history of egg allergy.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2007, **120**:1413-1417.

15. Sampson HA, McCaskill CC: **Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients.** *J Pediatr* 1985, **107**:669-675.
16. Sampson HA, Scanlon SM: **Natural history of food hypersensitivity in children with atopic dermatitis.** *J Pediatr* 1989, **115**:23-27.
17. Rangaraj S, Ramanathan V, Tuthill DP, Spear E, Hourihane JO, Alfaham M: **General paediatricians and the case of resolving peanut allergy.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 2004, **15**:449-453.
18. Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB, Sampson HA, Burks W, Wood RA: **The natural history of peanut allergy.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2001, **107**:367-374.
19. Fleischer DM, Conover-Walker MK, Matsui EC, Wood RA: **The natural history of tree nut allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, **116**:1087-1093.
20. Cohen A, Goldberg M, Levy B, Leshno M, Katz Y: **Sesame food allergy and sensitization in children: the natural history and long-term follow-up.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 2007, **18**:217-223.
21. Dannaeus A, Inganas M: **A follow-up study of children with food allergy. Clinical course in relation to serum IgE- and IgG-antibody levels to milk, egg and fish.** *Clin Allergy* 1981, **11**:533-539.
22. Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA). <http://www.cicbaa.com> . 2008.
Ref Type: Electronic Citation
23. Grundy J, Matthews S, Bateman B, Dean T, Arshad SH: **Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2002, **110**:784-789.
24. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA: **Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2003, **112**:1203-1207.
25. 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.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999, **103**:559-562.
26. Ortolani C, Bruijnzeel-Koomen C, Bengtsson U, Bindslev-Jensen C, Bjorksten B, Host A, Ispano M, Jarish R, Madsen C, Nekam K, Paganelli R, Poulsen LK, Wuthrich B: **Controversial aspects of adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Reactions to Food Subcommittee.** *Allergy.* 1999, **54**:27-45.
27. Dubuisson C, La Vielle S, Martin A. Allergie alimentaires : Etat des lieux et propositions d'orientation. 1-104. 2002. AFSSA.
Ref Type: Report

28. Morita E, Kunie K, Matsuo H: **Food-dependent exercise-induced anaphylaxis.** *J.Dermatol.Sci.* 2007, **47**:109-117.
29. Sorensen HT, Nielsen B, Ostergaard Nielsen J: **Anaphylactic shock occurring outside hospitals.** *Allergy* 1989, **44**:288-290.
30. Yocum MW, Butterfield JH, Klein JS, Volcheck GW, Schroeder DR, Silverstein MD: **Epidemiology of anaphylaxis in Olmsted County: A population-based study.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999, **104**:452-456.
31. Sampson HA: **Anaphylaxis and emergency treatment.** *Pediatrics* 2003, **111**:1601-1608.
32. Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA: **Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 1999, **10**:33-38.
33. Sicherer SH, Furlong TJ, Maes HH, Desnick RJ, Sampson HA, Gelb BD: **Genetics of peanut allergy: a twin study.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2000, **106**:53-56.
34. Ruiz RGG, Kemeny DM, Price JF: **Higher Risk of Infantile Atopic-Dermatitis from Maternal Atopy Than from Paternal Atopy.** *Clinical and Experimental Allergy* 1992, **22**:762-766.
35. Moneret-Vautrin DA, Rance F, Kanny G, Olsewski A, Gueant JL, Dutau G, Guerin L: **Food allergy to peanuts in France--evaluation of 142 observations.** *Clin Exp.Allergy.* 1998, **28**:1113-1119.
36. Ah-Leung S, Bernard H, Bidat E, Paty E, Rance F, Scheinmann P, Wal JM: **Allergy to goat and sheep milk without allergy to cow's milk.** *Allergy.* 2006, **61**:1358-1365.
37. Renauld JC: **Les mécanismes immunitaires impliqués dans l'allergie.** *LOUVAIN MED.* 2002, **121**:241-245.
38. Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Ikura Y, Tobe T: **Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children.** *Pediatric Allergy and Immunology* 2006, **17**:583-590.
39. Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin D, Kao WHL, Wahn U, Nickel R: **Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, **113**:489-495.
40. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Cho HJ, Kim S, Shin ES, Cho EY, Yang JM: **IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans.** *Allergy* 2007, **62**:934-942.
41. Wang TN, Chen WY, Huang YF, Shih NH, Feng WW, Tseng HI, Lee CH, Ko YC: **The synergistic effects of the IL-9 gene and environmental exposures on**

- asthmatic Taiwanese families as determined by the transmission/disequilibrium test.** *International Journal of Immunogenetics* 2006, **33**:105-110.
42. Zhang WD, Zhang XZ, Qiu DW, Sandford A, Tan WC: **IL-4 receptor genetic polymorphisms and asthma in Asian populations.** *Respiratory Medicine* 2007, **101**:186-190.
43. Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, Akizawa Y, Mitsuishi K, Ito T, Kawada H, Furukawa S, Ra C, Okumura K, Ogawa H: **A novel-66T/C polymorphism in Fc epsilon RI alpha-chain promoter affecting the transcription activity: Possible relationship to allergic diseases.** *Journal of Immunology* 2003, **171**:1927-1933.
44. Amoli MM, Hand S, Hajeer AH, Jones KP, Rolf S, Sting C, Davies BH, Ollier WER: **Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy.** *Genes and Immunity* 2002, **3**:220-224.
45. Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Kobayashi Y, Mochizuki H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A: **Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases.** *Clinical and Experimental Allergy* 2001, **31**:1509-1514.
46. Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A: **Linkage and association studies of STAT6 gene polymorphisms and allergic diseases.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2003, **131**:33-38.
47. Howell WM, Turner SJ, Hourihane JO, Dean TP, Warner JO: **HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: evidence from a family-based and case-control study.** *Clin Exp.Allergy.* 1998, **28**:156-162.
48. Hand S, Darke C, Thompson J, Stingl C, Rolf S, Jones KP, Davies BH: **Human leucocyte antigen polymorphisms in nut-allergic patients in South Wales.** *Clinical and Experimental Allergy* 2004, **34**:720-724.
49. Strachan DP: **Hay fever, hygiene, and household size.** *Bmj* 1989, **299**:1259-1260.
50. Filipiak B, Heinrich J, Schafer T, Ring J, Wichmann HE: **Farming, rural lifestyle and atopy in adults from southern Germany--results from the MONICA/KORA study Augsburg.** *Clin Exp.Allergy.* 2001, **31**:1829-1838.
51. Douwes J, Travier N, Huang K, Cheng S, McKenzie J, Le GG, von ME, Pearce N: **Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults.** *Allergy.* 2007, **62**:1158-1165.
52. Floistrup H, Swartz J, Bergstrom A, Alm JS, Scheynius A, van HM, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M, Zutavern A, von ME, Ublagger E, Riedler J, Michaels KB, Pershagen G, The Parsifal Study Group: **Allergic disease and sensitization in Steiner school children.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2006, **117**:59-66.
53. Lannero E, Wickman M, van Hage M, Bergstrom A, Pershagen G, Nordvall L: **Exposure to environmental tobacco smoke and sensitisation in children.** *Thorax* 2008, **63**:172-176.

54. Halken S, Host A: **Prevention.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001, **1**:229-236.
55. Riedel F, Krause A, Slenczka W, Rieger CHL: **Parainfluenza-3-virus infection enhances allergic sensitization in the guinea-pig.** *Clinical and Experimental Allergy* 1996, **26**:603-609.
56. Bloch KJ, Walker WA: **Effect of locally induced intestinal anaphylaxis on the uptake of a bystander antigen.** *J Allergy Clin Immunol* 1981, **67**:312-316.
57. Turner MW, Boulton P, Shields JG, Strobel S, Gibson S, Miller HR, Levinsky RJ: **Intestinal hypersensitivity reactions in the rat. I. Uptake of intact protein, permeability to sugars and their correlation with mucosal mast-cell activation.** *Immunology* 1988, **63**:119-124.
58. Gee JM, Wal JM, Miller K, Atkinson H, Grigoriadou F, Wijnands MVW, Penninks AH, Wortley G, Johnson IT: **Effect of saponin on the transmucosal passage of beta-lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and beta-lactoglobulin-sensitized rats.** *Toxicology* 1997, **117**:219-228.
59. Blank U, Jouvin MH, Guerin-Marchand C, Kinet JP: **[The high-affinity IgE receptor: lessons from structural analysis]**
Le recepteur de forte affinite pour l'IgE: lecons d'une analyse structurale. *Med.Sci.(Paris)*. 2003, **19**:63-69.
60. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP: **Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor.** *Nature* 1989, **337**:187-189.
61. Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet JP: **Expression of high-affinity binding of human immunoglobulin E by transfected cells.** *Science* 1989, **244**:187-189.
62. Malveaux FJ, Conroy MC, Adkinson NF, Jr., Lichtenstein LM: **IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration.** *J.Clin Invest.* 1978, **62**:176-181.
63. Hakimi J, Seals C, Kondas JA, Pettine L, Danho W, Kochan J: **The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding.** *J.Biol.Chem.* 1990, **265**:22079-22081.
64. Blank U, Ra CS, Kinet JP: **Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E.** *J.Biol.Chem.* 1991, **266**:2639-2646.
65. Hartman ML, Lin SY, Jouvin MH, Kinet JP: **Role of the extracellular domain of Fc epsilon RI alpha in intracellular processing and surface expression of the high affinity receptor for IgE Fc epsilon RI.** *Mol.Immunol.* 2008, **45**:2307-2311.
66. Repetto B, Bandara G, Kado-Fong H, Larigan JD, Wiggan GA, Pocius D, Basu M, Gilfillan AM, Kochan JP: **Functional contributions of the Fc epsilon RIalpha and Fc epsilon RIgamma subunit domains in Fc epsilon RI-mediated signaling in mast cells.** *J.Immunol.* 1996, **156**:4876-4883.

67. Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet JP: **A second amplifier function for the allergy-associated Fc(epsilon)RI-beta subunit.** *Immunity.* 2000, **12**:515-523.
68. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP: **The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals.** *Cell.* 1996, **85**:985-995.
69. Dombrowicz D, Lin S, Flamand V, Brini AT, Koller BH, Kinet JP: **Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses.** *Immunity.* 1998, **8**:517-529.
70. Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, Reininger B, Fischer GF, Wichlas S, Jouvin MH, Schmitt-Egenolf M, Kraft D, Kinet JP, Stingl G: **Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation.** *J.Immunol.* 1996, **157**:607-616.
71. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, Kinet JP, Stingl G: **Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals.** *J.Exp.Med.* 1994, **179**:745-750.
72. Bieber T, de la SH, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la SC: **Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI).** *J.Exp.Med.* 1992, **175**:1285-1290.
73. Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Fodinger D, Kinet JP, Stingl G: **Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI.** *J.Exp.Med.* 1992, **175**:1353-1365.
74. Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M: **High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites.** *Nature.* 1994, **367**:183-186.
75. Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, Vorng H, Sarfati M, Kinet JP, Tonnel AB, Capron A, Capron M: **Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors.** *Eur.J.Immunol.* 1997, **27**:2212-2218.
76. Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q: **Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma.** *FASEB J.* 2001, **15**:940-949.
77. Smith SJ, Ying S, Meng Q, Sullivan MH, Barkans J, Kon OM, Sihra B, Larche M, Levi-Schaffer F, Kay AB: **Blood eosinophils from atopic donors express messenger RNA for the alpha, beta, and gamma subunits of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) and intracellular, but not cell surface, alpha subunit protein.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2000, **105**:309-317.
78. Cook JP, Henry AJ, McDonnell JM, Owens RJ, Sutton BJ, Gould HJ: **Identification of contact residues in the IgE binding site of human FcepsilonRIalpha.** *Biochemistry.* 1997, **36**:15579-15588.

79. Nissim A, Jouvin MH, Eshhar Z: **Mapping of the high affinity Fc epsilon receptor binding site to the third constant region domain of IgE.** *EMBO J.* 1991, **10**:101-107.
80. Presta L, Shields R, O'Connell L, Lahr S, Porter J, Gorman C, Jardieu P: **The binding site on human immunoglobulin E for its high affinity receptor.** *J.Biol.Chem.* 1994, **269**:26368-26373.
81. Garman SC, Wurzburg BA, Tarchevskaya SS, Kinet JP, Jardetzky TS: **Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha.** *Nature.* 2000, **406**:259-266.
82. Keown MB, Ghirlando R, Young RJ, Beavil AJ, Owens RJ, Perkins SJ, Sutton BJ, Gould HJ: **Hydrodynamic studies of a complex between the Fc fragment of human IgE and a soluble fragment of the Fc epsilon RI alpha chain.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.* 1995, **92**:1841-1845.
83. Sechi S, Roller PP, Willette-Brown J, Kinet JP: **A conformational rearrangement upon binding of IgE to its high affinity receptor.** *J.Biol.Chem.* 1996, **271**:19256-19263.
84. Wan T, Beavil RL, Fabiane SM, Beavil AJ, Sohi MK, Keown M, Young RJ, Henry AJ, Owens RJ, Gould HJ, Sutton BJ: **The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation.** *Nat Immunol.* 2002, **3**:681-686.
85. Gould HJ, Sutton BJ: **IgE in allergy and asthma today.** *Nat Rev Immunol.* 2008, **8**:205-217.
86. Toru H, Ra C, Nonoyama S, Suzuki K, Yata J, Nakahata T: **Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4.** *Int.Immunol.* 1996, **8**:1367-1373.
87. Novak N, Tepel C, Koch S, Brix K, Bieber T, Kraft S: **Evidence for a differential expression of the Fc epsilon RI gamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors.** *J.Clin Invest.* 2003, **111**:1047-1056.
88. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB: **Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations.** *J.Allergy Clin Immunol.* 1997, **99**:699-706.
89. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ: **IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions.** *J.Exp.Med.* 1997, **185**:663-672.
90. Lantz CS, Yamaguchi M, Oettgen HC, Katona IM, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ: **IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo.** *J.Immunol.* 1997, **158**:2517-2521.
91. MacGlashan DW, Jr., Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, Kenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM: **Down-regulation of**

-
- Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody.** *J.Immunol.* 1997, **158**:1438-1445.
92. Yokota A, Kikutani H, Tanaka T, Sato R, Barsumian EL, Suemura M, Kishimoto T: **Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression.** *Cell* 1988, **55**:611-618.
 93. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J.Immunol.* 1986, **136**:2348-2357.
 94. Del Prete GF, De CM, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S: **Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production.** *J.Clin Invest.* 1991, **88**:346-350.
 95. Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S: **Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.* 1991, **88**:4538-4542.
 96. Romagnani S: **Short analytical review - TH1 and TH2 in human diseases.** *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996, **80**:225-235.
 97. Romagnani S: **The Th1/Th2 paradigm.** *Immunology Today* 1997, **18**:263-266.
 98. Romagnani S: **The role of lymphocytes in allergic disease.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000, **105**:399-408.
 99. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K: **Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma.** *Clinical and Experimental Immunology* 1999, **118**:9-15.
 100. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S: **Th17 and allergy.** *Allergol.Int.* 2008, **57**:121-134.
 101. Weiner HL: **Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.** *Microbes.Infect.* 2001, **3**:947-954.
 102. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C: **IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy.** *Cell Mol Immunol.* 2007, **4**:269-275.
 103. Romagnani S: **Regulation of the T cell response.** *Clin Exp.Allergy.* 2006, **36**:1357-1366.
 104. Nakamura K, Kitani A, Strober W: **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.** *Journal of Experimental Medicine* 2001, **194**:629-644.

105. Welle M: **Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase.** *Journal of Leukocyte Biology* 1997, **61**:233-245.
106. Arock M: **Similarities and differences between mast cells and basophil.** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2004, **44**:23-36.
107. Adel-Patient K, Ah-Leung S, Bernard H, Durieux-Alexandrenne C, Creminon C, Wal JM: **Oral sensitization to peanut is highly enhanced by application of peanut extracts to intact skin, but is prevented when CpG and cholera toxin are added.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2007, **143**:10-20.
108. Hsieh KY, Tsai CC, Wu CH, Lin RH: **Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy.** *Clin Exp.Allergy.* 2003, **33**:1067-1075.
109. Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS: **Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice.** *J.Clin Invest.* 1998, **101**:1614-1622.
110. Strid J, Hourihane J, Kimber I, Callard R, Strobel S: **Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization.** *Clin Exp.Allergy.* 2005, **35**:757-766.
111. Wang G, Savinko T, Wolff H, eu-Nosjean MC, Kemeny L, Homey B, Lauerma AI, Alenius H: **Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice.** *Clin Exp.Allergy.* 2007, **37**:151-161.
112. Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J: **Factors associated with the development of peanut allergy in childhood.** *N.Engl.J.Med.* 2003, **348**:977-985.
113. Guillet G, Guillet MH: **[Percutaneous sensitization to almond oil in infancy and study of ointments in 27 children with food allergy].** *Allerg Immunol (Paris)* 2000, **32**:309-311.
114. Leser C, Hartmann AL, Praml G, Wuthrich B: **The "egg-egg" syndrome: Occupational respiratory allergy to airborne egg proteins with consecutive ingestive egg allergy in the bakery and confectionery industry.** *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2001, **11**:89-93.
115. Neutra MR: **Current Concepts in Mucosal Immunity - V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1998, **37**:G785-G791.
116. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Forster R, Pabst O: **Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2006, **203**:519-527.
117. Mallegol J, van Niel G, Heyman M: **Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes.** *Blood Cells Molecules and Diseases* 2005, **35**:11-16.

118. Adel-Patient K, Bernard H, Wal JM: **Fate of food allergens in the digestive tract.** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2008, **48**:335-343.
119. Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Immunologie*, edn 3ème édition, traduction "Immunology" 3rd edition, 1993 par JP Revillard et WH Fridman. Be Boeck Université; 1994.
120. van Panhuys N, Tang SC, Prout M, Camberis M, Scarlett D, Roberts J, Hu-Li J, Paul WE, Le Gros G: **In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:12423-12428.
121. Akimoto T, Numata F, Tamura M, Takata Y, Higashida N, Takashi T, Takeda K, Akira S: **Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice.** *Journal of Experimental Medicine* 1998, **187**:1537-1542.
122. Kuperman D, Schofield B, Wills-Karp M, Grusby MJ: **Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production.** *Journal of Experimental Medicine* 1998, **187**:939-948.
123. Webb DC, McKenzie ANJ, Koskinen AML, Yang M, Mattes J, Foster PS: **Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity.** *Journal of Immunology* 2000, **165**:108-113.
124. Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, Charlop-Powers Z, Grishina G, Yoo S, Burks AW, Sampson HA: **The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro.** *Journal of Immunology* 2006, **177**:3677-3685.
125. Liu T, He SH, Zheng PY, Zhang TY, Wang BQ, Yang PC: **Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naive CD4 T cells to differentiate into Th2 cells.** *Molecular Immunology* 2007, **44**:3580-3587.
126. Blank U, Rivera J: **The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis.** *Trends in Immunology* 2004, **25**:266-273.
127. Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns RP, Bischoff SC: **Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: Role of IgE receptor cross-linking and IL-4.** *Journal of Immunology* 2000, **164**:43-48.
128. Chvatchko Y, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Lefort J, Bonnefoy JY: **Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge.** *Journal of Experimental Medicine* 1996, **184**:2353-2360.
129. Ogilvie BM: **Reagin-like antibodies in rats infected with the nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*.** *Immunology*. 1967, **12**:113-131.
130. Loukas A, Prociv P: **Immune responses in hookworm infections.** *Clinical Microbiology Reviews* 2001, **14**:689-703.

131. Sampson HA: **Update on food allergy.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2004, **113**:805-819.
132. Hill DJ, Hosking CS, Zhie CY, Leung R, Baratwidjaja K, Iikura Y, Iyngkaran N, Gonzalez-Andaya A, Wah LB, Hsieh KH: **The frequency of food allergy in Australia and Asia.** *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1997, **4**:101-110.
133. Dutau G, Rittie JL, Rance F, Juchet A, Bremont F: **New food allergens.** *Presse Medicale* 1999, **28**:1553-1559.
134. Ostblom E, Lilja G, Pershagen G, van HM, Wickman M: **Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life.** *Clin Exp.Allergy.* 2008, **38**:1325-1332.
135. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA: **Fatalities due to anaphylactic reactions to foods.** *J.Allergy Clin.Immunol.* 2001, **107**:191-193.
136. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA: **Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006.** *J.Allergy Clin.Immunol.* 2007, **119**:1016-1018.
137. Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C: **The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 2005, **16**:567-573.
138. Fleischer DM, Conover-Walker MK, Christie L, Burks AW, Wood RA: **The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2003, **112**:183-189.
139. Ho MH, Wong WH, Heine RG, Hosking CS, Hill DJ, Allen KJ: **Early clinical predictors of remission of peanut allergy in children.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2008, **121**:731-736.
140. Hourihane JO, Roberts SA, Warner JO: **Resolution of peanut allergy: case-control study.** *BMJ.* 1998, **316**:1271-1275.
141. Fleischer DM, Conover-Walker MK, Christie L, Burks AW, Wood RA: **Peanut allergy: recurrence and its management.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2004, **114**:1195-1201.
142. Le TM, Lindner TM, Pasmans SG, Guikers CL, van HE, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC: **Reported food allergy to peanut, tree nuts and fruit: comparison of clinical manifestations, prescription of medication and impact on daily life.** *Allergy.* 2008, **63**:910-916.
143. Flinterman AE, Pasmans SG, Hoekstra MO, Meijer Y, van Hoffen E, Knol EF, Hefle SL, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC: **Determination of no-observed-adverse-effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, **117**:448-454.
144. Maloney JM, Chapman MD, Sicherer SH: **Peanut allergen exposure through saliva: Assessment and interventions to reduce exposure.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, **118**:719-724.

145. Wuthrich B, Dascher M, Borelli S: **Kiss-induced allergy to peanut.** *Allergy* 2001, **56**:913.
146. Hourihane JO, Kilburn SA, Nordlee JA, Hefle SL, Taylor SL, Warner JO: **An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: A randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997, **100**:596-600.
147. Peeters KA, Koppelman SJ, van HE, van der Tas CW, den Hartog Jager CF, Penninks AH, Hefle SL, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, Knulst AC: **Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy?** *Clin Exp.Allergy.* 2007, **37**:108-115.
148. Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knulst AC: **The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **110**:915-920.
149. Bindslev-Jensen C, Briggs D, Osterballe M: **Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature?** *Allergy* 2002, **57**:741-746.
150. Ewan PW: **Clinical study of peanut and nut allergy in 62 consecutive patients: New features and associations.** *British Medical Journal* 1996, **312**:1074-1078.
151. Hourihane JO, Dean TP, Warner JO: **Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: Results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges.** *British Medical Journal* 1996, **313**:518-521.
152. Bock SA, Atkins FM: **The natural history of peanut allergy.** *J Allergy Clin Immunol* 1989, **83**:900-904.
153. Foucard T, Yman IM: **A study on severe food reactions in Sweden - is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis?** *Allergy* 1999, **54**:261-265.
154. 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.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999, **104**:883-888.
155. Wensing M, Knulst AC, Piersma S, O'Kane F, Knol EF, Koppelman SJ: **Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1).** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **111**:420-424.
156. de Leon M, Drew A, Glaspole I, Suphioglu C, O'Hehir R, Rolland J: **IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h 2 and tree nut allergens.** *Molecular Immunology* 2007, **44**:463-471.
157. Xiang P, Beardslee TA, Zeece MG, Markwell J, Sarath G: **Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, **408**:51-57.

158. Palomares O, Vereda A, Cuesta-Herranz J, Vilialba M, Rodriguez R: **Cloning, sequencing, and recombinant production of Sin a 2, an allergenic 11S globulin from yellow mustard seeds.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007, **119**:1189-1196.
159. Tombs MP: **An Electrophoretic Investigation of Groundnut Proteins: the Structure of Arachins A and B.** *Biochem J* 1965, **96**:119-133.
160. Johnson P, Naismith WE: **Further physico-chemical studies of the conarachin fraction of the globulins of the groundnut (*Arachis hypogaea*).** *Biochim Biophys Acta* 1954, **15**:377-389.
161. Mondoulet L. Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs. 249p. Thèse de doctorat de l'INSA de Toulouse, Spécialité Microbiologie et Biocatalyse Industrielles, Toulouse, n°783 . 2005.
Ref Type: Thesis/Dissertation
162. Chatel JM, Bernard H, Orson FM: **Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA.** *Int Arch Allergy Immunol* 2003, **131**:14-18.
163. Bernard H, Mondoulet L, Drumare MF, Paty E, Scheinmann P, Thai R, Wal JM: **Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut.** *J Agric.Food Chem.* 2007, **55**:9663-9669.
164. Koppelman SJ, Vlooswijk RA, Knippels LM, Hessing M, Knol EF, van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA: **Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world.** *Allergy.* 2001, **56**:132-137.
165. van Wijk F, Nierkens S, Hassing I, Feijen M, Koppelman SJ, de Jong GAH, Pieters R, Knippels LMJ: **The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens.** *Toxicological Sciences* 2005, **86**:333-341.
166. Sachs MI, Jones RT, Yunginger JW: **Isolation and partial characterization of a major peanut allergen.** *J Allergy Clin Immunol* 1981, **67**:27-34.
167. Barnett D, Baldo BA, Howden ME: **Multiplicity of allergens in peanuts.** *J Allergy Clin Immunol* 1983, **72**:61-68.
168. Burks AW, Williams LW, Helm RM, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T: **Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges.** *J Allergy Clin.Immunol.* 1991, **88**:172-179.
169. Bernard H, Paty E, Mondoulet L, Burks AW, Bannon GA, Wal JM, Scheinmann P: **Serological characteristics of peanut allergy in children.** *Allergy.* 2003, **58**:1285-1292.
170. Kleber-Janke T, Crameri R, Appenzeller U, Schlaak M, Becker WM: **Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology.** *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1999, **119**:265-274.

171. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien TJ, Helm RM: **Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge.** *J Allergy Clin.Immunol.* 1992, **90**:962-969.
172. Chatel JM, Bernard H, Orson FM: **Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA.** *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2003, **131**:14-18.
173. Flinterman AE, van HE, den Hartog Jager CF, Koppelman S, Pasmans SG, Hoekstra MO, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Knol EF: **Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time.** *Clin.Exp.Allergy.* 2007, **37**:1221-1228.
174. Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, Knulst AC, Knol EF: **Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen.** *Clin.Exp.Allergy.* 2004, **34**:583-590.
175. Koppelman SJ, de Jong GA, Laaper-Ertmann M, Peeters KA, Knulst AC, Hefle SL, Knol EF: **Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2.** *Clin.Exp.Allergy.* 2005, **35**:490-497.
176. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA: **Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3.** *J Clin.Invest.* 1999, **103**:535-542.
177. Koppelman SJ, Knol EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle SL, Gruppen H, Piersma S: **Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization.** *Allergy.* 2003, **58**:1144-1151.
178. Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, Koppelman SJ, Knulst AC, Helbling A, Hefle SL, Van RR, Vieths S: **Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy.** *J Allergy Clin.Immunol.* 2004, **114**:1410-1417.
179. Lauer I, Dueringer N, Pokoj S, Foetisch K, Reese G, San Miguel-Moncin M, Malet A, Cistero-Bahima A, Enrique E, Vieths S, Scheurer S: **Peanut lipid transfer protein (Ara h 9): expression, characterisation and its biological activity in comparison to the peach LTP, Pru p 3.** *Allergy* 2008, **63**:118.
180. Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC, Gueant JL: **The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts.** *Allergy* 2002, **57**:88-93.
181. Burks AW, Shin D, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA: **Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity.** *European Journal of Biochemistry* 1997, **245**:334-339.

182. Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA: **Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3.** *Journal of Clinical Investigation* 1999, **103**:535-542.
183. Stanley JS, King N, Burks AW, Huang SK, Sampson H, Cockrell G, Helm RM, West CM, Bannon GA: **Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997, **342**:244-253.
184. Palmer GW, Dibbern DA, Jr., Burks AW, Bannon GA, Bock SA, Porterfield HS, McDermott RA, Dreskin SC: **Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity.** *Clin.Immunol.* 2005, **115**:302-312.
185. Lehmann K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Suhr M, Becker WM, Vieths S, Rosch P: **Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions.** *Biochemical Journal* 2006, **395**:463-472.
186. Eiwegger T, Rigby N, Mondoulet L, Bernard H, Krauth MT, Boehm A, Dehlink E, Valent P, Wal JM, Mills ENC, Szepefalusi Z: **Gastro-duodenal digestion products of the major peanut allergen Ara h 1 retain an allergenic potential.** *Clinical and Experimental Allergy* 2006, **36**:1281-1288.
187. Rigby N, Watson A, Mondoulet L, Eiwegger T, Szepefalusi Z, Nielsen K, Madsen C, Adel-Patient K, Bernard H, Wal JM, Mills ENC: **Aggregated pepsinolysis products of the major peanut allergen Ara h1 are IgE reactive.** *soumis à J Biological Chemistry* 2008.
188. Tikkanen S, Kokkonen J, Juntti H, Niinimäki A: **Status of children with cow's milk allergy in infancy by 10 years of age.** *Acta Paediatrica* 2000, **89**:1174-1180.
189. Levy Y, Segal N, Garty B, Danon YL: **Lessons from the clinical course of IgE-mediated cow milk allergy in Israel.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 2007, **18**:589-593.
190. Lam HY, van HE, Michelsen A, Guikers K, van der Tas CH, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC: **Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved.** *Clin Exp.Allergy.* 2008, **38**:995-1002.
191. Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Bock SA, Burks AW, Christie L, Hill DJ, Host A, Hourihane JO, Lack G, Metcalfe DD, Moneret-Vautrin DA, Vadas PA, Rance F, Skrypec DJ, Trautman TA, Yman IM, Zeiger RS: **Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much?** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **109**:24-30.
192. Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guenard L, Beaudouin E, Flabbee J, Hatahet R: **Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges.** *Clinical and Experimental Allergy* 2003, **33**:1046-1051.

193. Wal JM, Bernard H, Clément G, Chatel JM, Adel-Patient K: **Characterization of allergens in milk.** *Current Allergy & Clinical Immunology* 2001, **14**:4-10.
194. Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L: **Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy.** *J.Allergy Clin Immunol.* 1999, **103**:1191-1194.
195. Paty E, Chedevergne F, Scheinmann P, Wal JM, Bernard H: **Allergy to goat's milk and sheep's milk without allergy to cow's milk.** *Revue Francaise D Allergologie et D Immunologie Clinique* 2003, **43**:455-462.
196. Wuthrich B, Johansson SGO: **Allergy to Cheese Produced from Sheeps and Goats Milk But Not to Cheese Produced from Cows Milk.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1995, **96**:270-273.
197. Umpierrez A, Quirce S, Maranon F, Cuesta J, Garcia-Villamuza Y, Lahoz C, Sastre J: **Allergy to goat and sheep cheese with good tolerance to cow cheese.** *Clinical and Experimental Allergy* 1999, **29**:1064-1068.
198. Bernard H, Negroni L, Chatel JM, Clement G, del-Patient K, Peltre G, Creminon C, Wal JM: **Molecular basis of IgE cross-reactivity between human beta-casein and bovine beta-casein, a major allergen of milk.** *Molecular Immunology* 2000, **37**:161-167.
199. Maynard F, Chatel JM, Wal JM: **Immunological IgE cross-reactions of bovine and human alpha-lactalbumins in cow's milk allergic patients.** *Food and Agricultural Immunology* 1999, **11**:179-189.
200. Werfel SJ, Cooke SK, Sampson HA: **Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997, **99**:293-300.
201. Wal JM: **Cow's milk allergens.** *Allergy.* 1998, **53**:1013-1022.
202. Papiz MZ, Sawyer L, Eliopoulos EE, North AC, Findlay JB, Sivaprasadarao R, Jones TA, Newcomer ME, Kraulis PJ: **The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein.** *Nature* 1986, **324**:383-385.
203. Cho YJ, Batt CA, Sawyer L: **Probing the Retinol-Binding Site of Bovine Beta-Lactoglobulin.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:11102-11107.
204. Burova TV, Choiset Y, Tran V, Haertle T: **Role of free Cys121 in stabilization of bovine beta-lactoglobulin B.** *Protein Engineering* 1998, **11**:1065-1073.
205. Wal JM, Bernard H, Creminon C, Hamberger C, David B, Peltre G: **Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens.** *Adv.Exp Med.Biol.* 1995, **371B**:879-881.
206. Bernard H, Creminon C, Yvon M, Wal JM: **Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins.** *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1998, **115**:235-244.

207. Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K: **Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders.** *Allergy*. 2005, **60**:912-919.
208. Busse PJ, Jarvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA: **Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients.** *Int.Arch.Allergy Immunol*. 2002, **129**:93-96.
209. Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA: **Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy.** *J.Allergy Clin Immunol*. 2001, **107**:379-383.
210. Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA: **Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients.** *Clin Exp.Allergy*. 2001, **31**:1256-1262.
211. Elsayed S, Hill DJ, Do TV: **Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk alphas1-casein using extensively purified synthetic peptides.** *Scand.J.Immunol*. 2004, **60**:486-493.
212. Spuerger P, Mueller H, Walter M, Schiltz E, Forster J: **Allergenic epitopes of bovine alpha S1-casein recognized by human IgE and IgG.** *Allergy*. 1996, **51**:306-312.
213. Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA: **IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy.** *Int.Arch.Allergy Immunol*. 2001, **126**:111-118.
214. Wal JM: **Structure and function of milk allergens.** *Allergy*. 2001, **56 Suppl 67**:35-38.
215. Jarvinen KM, Beyer K, Vila L, Chatchatee P, Busse PJ, Sampson HA: **B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy.** *J Allergy Clin Immunol* 2002, **110**:293-297.
216. Vila L, Beyer K, Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA: **Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy.** *Clinical and Experimental Allergy* 2001, **31**:1599-1606.
217. Schafer T, Bohler E, Ruhdorfer S, Weigl L, Wessner D, Heinrich J, Filipiak B, Wichmann HE, Ring J: **Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy.** *Allergy*. 2001, **56**:1172-1179.
218. Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, Ferreira F, Sperr WR, Valent P, Rohac M, Rumpold H, Scheiner O, Kraft D: **Identification of Common Allergenic Structures in Hazel Pollen and Hazelnuts - A Possible Explanation for Sensitivity to Hazelnuts in Patients Allergic to Tree Pollen.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1992, **90**:927-936.
219. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Luttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wutrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C, Conti A: **Identification of hazelnut major**

- allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **109**:563-570.
220. Schocker F, Luttkopf D, Scheurer S, Petersen A, Cistero-Bahima A, Enrique E, San Miguel-Moncin M, Akkerdaas J, van Ree R, Vieths S, Becker WM: **Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: A new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, **113**:141-147.
221. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Grishin A, Sampson HA: **Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **110**:517-523.
222. Lauer I, Foetisch K, Kolarich D, Ballmer-Weber BK, Conti A, Altmann F, Vieths S, Scheurer S: **Hazelnut (Corylus avellana) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity.** *Biochemical Journal* 2004, **383**:327-334.
223. Gruehn S, Suphioglu C, O'Hehir RE, Volkmann D: **Molecular cloning and characterization of hazel pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): A novel cross-reactive plant allergen.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2003, **131**:91-100.
224. Akkerdaas JH, Schocker F, Vieths S, Versteeg S, Zuidmeer L, Hefle SL, Aalberse RC, Richter K, Ferreira F, van Ree R: **Cloning of oleosin, a putative new hazelnut allergen, using a hazelnut cDNA library.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2006, **50**:18-23.
225. Hansen KS, Ballmer-Weber BK, Luttkopf D, Skov PS, Wuthrich B, Bindslev-Jensen C, Vieths S, Poulsen LK: **Roasted hazelnuts - allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge.** *Allergy* 2003, **58**:132-138.
226. Schocker F, Luttkopf D, Muller U, Thomas P, Vieths S, Becker WM: **IgE binding to unique hazelnut allergens: Identification of non pollen-related and heat-stable hazelnut allergens eliciting severe allergic reactions.** *European Journal of Nutrition* 2000, **39**:172-180.
227. Wide L, Bennich H, Johansson SG: **Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies.** *Lancet* 1967, **2**:1105-1107.
228. Sampson HA, Ho DG: **Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997, **100**:444-451.
229. Celik-Bilgili S, Mehl A, Verstege A, Staden U, Nocon M, Beyer K, Niggemann B: **The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges.** *Clinical and Experimental Allergy* 2005, **35**:268-273.
230. Osterballe M, Bindslev-Jensen C: **Threshold levels in food challenge and specific IgE in patients with egg allergy: Is there a relationship?** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**:196-201.

231. Garcia-Ara C, Boyano-Martinez T, az-Pena JM, Martin-Munoz F, Reche-Frutos M, Martin-Esteban M: **Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, **107**:185-190.
232. Bernard H, Paty E, Mondoulet L, Burks AW, Bannon GA, Wal JM, Scheinmann P: **Serological characteristics of peanut allergy in children.** *Allergy* 2003, **58**:1285-1292.
233. Zimmermann EM, Yunginger JW, Gleich GJ: **Interference in ragweed pollen and honeybee venom radioallergosorbent tests.** *J Allergy Clin Immunol* 1980, **66**:386-393.
234. Lee TM, Grammer LC, Shaughnessy MA: **Estimation of IgE antibody with a nonisotopic technique with no interference of isotypic antibodies.** *J Allergy Clin Immunol* 1988, **82**:812-817.
235. Olivieri V, Beccarini I, Gallucci G, Romano T, Santoro F: **Capture Assay for Specific Ige - An Improved Quantitative Method.** *Journal of Immunological Methods* 1993, **157**:65-72.
236. Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, Richards D: **Improved sensitivity and specificity of sandwich, competitive and capture enzyme-linked immunosorbent assays for allergen-specific antibodies.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985, **77**:198-200.
237. Light WC, Reisman RE, Rosario NA, Arbesman CE: **Comparison of the allergenic properties of bee venom and whole bee body extract.** *Clin Allergy* 1976, **6**:293-300.
238. Nordlee JA, Taylor SL, Jones RT, Yunginger JW: **Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition.** *J Allergy Clin Immunol* 1981, **68**:376-382.
239. Benveniste J: **The human basophil degranulation test as an in vitro method for the diagnosis of allergies.** *Clin Allergy* 1981, **11**:1-11.
240. James JM, Kageysobotka A, Sampson HA: **Patients with Severe Atopic-Dermatitis Have Activated Circulating Basophils.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1993, **91**:1155-1162.
241. Knol EF, Mul FP, Jansen H, Calafat J, Roos D: **Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435.** *J Allergy Clin Immunol* 1991, **88**:328-338.
242. Moneret-Vautrin DA, Sainte-Laudy J, Kanny G, Fremont S: **Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy.** *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 1999, **82**:33-40.
243. Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, Biennvenu J: **Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63.** *Clinical and Experimental Allergy* 2003, **33**:259-265.

244. Bernstein IL, Vijay HM, Perelmutter L: **Non-responder basophils in highly ragweed-sensitive subjects.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1977, **55**:215-216.
245. Nolte H, Stafanger G, Skov PS, Schiotz PO: **Passive sensitization of basophil leukocytes from non-atopic adult by plasma from allergic children.** *Allergy* 1988, **43**:32-38.
246. Devey ME, Anderson KJ, Coombs RR, Henschel MJ, Coates ME: **The modified anaphylaxis hypothesis for cot death. Anaphylactic sensitization in guinea-pigs fed cow's milk.** *Clin Exp Immunol* 1976, **26**:542-548.
247. 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**:217-231.
248. Knippels LMJ, Penninks AH, Spanhaak S, Houben GF: **Oral sensitization to food proteins: a brown Norway rat model.** *Clinical and Experimental Allergy* 1998, **28**:368-375.
249. Knippels LMJ, van der Kleij HPM, Koppelman SJ, Houben GF, Penninks AH, Knippels LMJ, Penninks AH, Felius AA: **Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients.** *Allergy* 2000, **55**:251-258.
250. Atkinson HAC, Miller K: **Assessment of the Brown-Norway Rat As A Suitable Model for the Investigation of Food Allergy.** *Toxicology* 1994, **91**:281-288.
251. Miller K, Meredith C, Selo I, Wal JM: **Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of immunoglobulin E generated in the Brown Norway rat to tryptic and synthetic peptides.** *Clinical and Experimental Allergy* 1999, **29**:1696-1704.
252. Hsieh CS, Macatonia SE, Ogarra A, Murphy KM: **T-Cell Genetic Background Determines Default T-Helper Phenotype Development In-Vitro.** *Journal of Experimental Medicine* 1995, **181**:713-721.
253. Dearman RJ, Kimber I: **Determination of protein allergenicity: studies in mice.** *Toxicology Letters* 2001, **120**:181-186.
254. Adel-Patient K, imaraes V, umare MF, -Leung S, mourette P, vers MC, reclus D, har M, rnard H, l JM, eminon C: **Immunological studies of Cry1Ab insecticidal protein in a mouse model.** *soumis à Food and Chemical Toxicology* 2008.
255. Buchanan BB, Frick OL: **The dog as a model for food allergy.** *Ann N Y Acad Sci.* 2002, **964**:173-183.
256. Teuber SS, del Val G, Morigasaki S, Jung HR, Eisele PH, Frick OL, Buchanan BB: **The atopic dog as a model of peanut and tree nut food allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **110**:921-927.
257. Helm RM, Furuta GT, Stanley JS, Ye JH, Cockrell G, Connaughton C, Simpson P, Bannon GA, Burks AW: **A neonatal swine model for peanut allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, **109**:136-142.

258. Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA: **A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999, **103**:206-214.
259. Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA: **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**:150-158.
260. Adel-Patient K, Bernard H, Ah-Leung S, Creminon C, Wal JM: **Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin.** *Allergy* 2005, **60**:658-664.
261. Adel-Patient K, Nahori MA, Proust B, Lapa e Silva JR, Creminon C, Wal JM, Vargaftig BB: **Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge.** *Clin.Exp.Allergy* 2003, **33**:376-385.
262. Osterballe O, Weeke B: **A new lancet for skin prick testing.** *Allergy* 1979, **34**:209-212.
263. Dreborg S: **Diagnosis of food allergy: tests in vivo and in vitro.** *Pediatric Allergy and Immunology* 2001, **12**:24-30.
264. Kim TE, Park SW, Noh G, Lee S: **Comparison of Skin Prick Test results between crude allergen extracts from foods and commercial allergen extracts in atopic dermatitis by double-blind placebo-controlled food challenge for milk, egg, and soybean.** *Yonsei Medical Journal* 2002, **43**:613-620.
265. Norgaard A, Skov PS, Bindslevjensen C: **Egg and Milk Allergy in Adults - Comparison Between Fresh Foods and Commercial Allergen Extracts in Skin Prick Test and Histamine-Release from Basophils.** *Clinical and Experimental Allergy* 1992, **22**:940-947.
266. Ballmer-Weber BK, Vieths S, Bucher C, Luttkopf D, Wuthrich B: **Hazelnut allergy. Validation of diagnostic procedures on the basis of double-blind placebo-controlled food challenges.** *Allergologie* 2000, **23**:285-291.
267. Verstege A, Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Nocon M, Beyer K, Niggemann B: **The predictive value of the skin prick test weal size for the outcome of oral food challenges.** *Clinical and Experimental Allergy* 2005, **35**:1220-1226.
268. Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, Warner JO: **Clinical characteristics of peanut allergy.** *Clinical and Experimental Allergy* 1997, **27**:634-639.
269. Hourihane JO, Grimshaw KEC, Lewis SA, Briggs RA, Trewin JB, King RM, Kilburn SA, Warner JO: **Does severity of low-dose, double-blind, placebo-controlled food challenges reflect severity of allergic reactions to peanut in the community?** *Clinical and Experimental Allergy* 2005, **35**:1227-1233.

270. Santos C, Deschildre A, Paty E, Couderc L, Marguet C, Rance F: **Oral food challenge in children: who, when, and how? Procedures.** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2006, **46**:659-669.
271. Host A, Andrae S, Charkin S, az-Vazquez C, Dreborg S, Eigenmann PA, Friedrichs F, Grinstead P, Lack G, Meylan G, Miglioranza P, Muraro A, Nieto A, Niggemann B, Pascual C, Pouech MG, Rance F, Rietschel E, Wickman M: **Allergy testing in children: why, who, when and how?** *Allergy* 2003, **58**:559-569.
272. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL: **Stability of food allergens to digestion in vitro.** *Nature Biotechnology* 1996, **14**:1269-1273.
273. Fu TT, Abbott UR, Hatzos C: **Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid - A comparative study.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, **50**:7154-7160.
274. Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J: **A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2004, **39**:87-98.
275. Moreno FJ: **Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2007, **61**:50-60.
276. Lucas JS, Cochrane SA, Warner JO, Hourihane JO: **The effect of digestion and pH on the allergenicity of kiwifruit proteins.** *Pediatr.Allergy Immunol.* 2007, **19**:392-398.
277. Breiteneder H, Radauer C: **A classification of plant food allergens.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, **113**:821-830.
278. Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel MM, Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A, Vieths S: **Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion.** *J.Allergy Clin Immunol.* 2004, **114**:900-907.
279. Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Papadopoulos NG, Saxoni-Papageorgiou P, van Ree R, Mills C: **Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, **118**:473-480.
280. Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MSJ, Bottrill AR, Mills ENC: **Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion.** *Febs Journal* 2005, **272**:341-352.
281. Mills ENC, Jenkins J, Marigheto N, Belton PS, Gunning AP, Morris VJ: **Allergens of the cupin superfamily.** *Biochemical Society Transactions* 2002, **30**:925-929.

282. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA: **Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation.** *Journal of Immunology* 2000, **164**:5844-5849.
283. Bublin M, Radauer C, Knulst A, Wagner S, Scheiner O, Mackie AR, Mills EN, Breiteneder H: **Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein.** *Mol Nutr Food Res.*2008.Jul.24. 2008.
284. Untersmayr E, Poulsen LK, Platzer MH, Pedersen MH, Boltz-Nitulescu G, Skov PS, Jensen-Jarolim E: **The effects of gastric digestion on codfish allergenicity.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, **115**:377-382.
285. Lee BJ, Park HS: **Common whelk (*Buccinum undatum*) allergy: Identification of IgE-binding components and effects of heating and digestive enzymes.** *Journal of Korean Medical Science* 2004, **19**:793-799.
286. Fiocchi A, Restani P, Riva E, Restelli AR, Biasucci G, Galli CL, Giovannini M: **Meat Allergy .2. Effects of Food-Processing and Enzymatic Digestion on the Allergenicity of Bovine and Ovine Meats.** *Journal of the American College of Nutrition* 1995, **14**:245-250.
287. Wal JM: **Bovine milk allergenicity.** *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 2004, **93**:S2-S11.
288. Jakobsson I, Lindberg T, Benediktsson B: **In vitro digestion of cow's milk proteins by duodenal juice from infants with various gastrointestinal disorders.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982, **1**:183-191.
289. Haddad ZH, Kalra V, Verma S: **IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of betalactoglobulin: significance in food hypersensitivity.** *Ann Allergy* 1979, **42**:368-371.
290. Selo I, Clement G, Bernard H, Chatel J, Creminon C, Peltre G, Wal J: **Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides.** *Clin Exp Allergy.* 1999, **29**:1055-1063.
291. Reese G, Daul CB, Lehrer SB: **Antigenic Analysis (Ige and Monoclonal-Antibodies) of the Major Shrimp Allergen Pen-A-1 (Tropomyosin) from *Penaeus-Aztecus*.** *International Archives of Allergy and Immunology* 1995, **107**:245-247.
292. Urisu A, Yamada K, Tokuda R, Ando H, Wada E, Kondo Y, Morita Y: **Clinical significance of IgE-binding activity to enzymatic digests of ovomucoid in the diagnosis and the prediction of the outgrowing of egg white hypersensitivity.** *International Archives of Allergy and Immunology* 1999, **120**:192-198.
293. Yamada K, Urisu A, Kakami M, Koyama H, Tokuda R, Wada E, Kondo Y, Ando H, Morita Y, Torii S: **IgE-binding activity to enzyme-digested ovomucoid distinguishes between patients with contact urticaria to egg with and without overt symptoms on ingestion.** *Allergy* 2000, **55**:565-569.

294. Schimek EM, Zwolfer B, Briza P, Jahn-Schmid B, Vogel L, Vieths S, Ebner C, Bohle B: **Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, **116**:1327-1333.
295. Scheurer S, Wangorsch A, Nerkamp J, Skov PS, Ballmer-Weber B, Wuthrich B, Hausteine D, Vieths S: **Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2.** *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2001, **756**:315-325.
296. Jankiewicz A, Baltes W, Bogl KW, Dehne LI, Jamin A, Hoffmann A, Hausteine D, Vieths S: **In vitro study of the gastrointestinal stability of celery allergens.** *Food and Agricultural Immunology* 1997, **9**:203-217.
297. Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, Wangorsch A, Hausteine D, Vieths S: **IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2002, **128**:105-114.
298. Chen ZP, Posch A, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X: **Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998, **102**:476-481.
299. Mikkola JH, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T: **Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998, **102**:1005-1012.
300. Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z: **Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000, **106**:752-762.
301. Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G: **Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**:1002-1007.
302. Mills E, Moreno J, Sancho A, Jenkins J, Wichers H: **Processing approaches to reducing allergenicity in proteins.** *Proteins in food processing* 2004,396-418.
303. Allergest. "The effect of Gastrointestinal Digestion on the Allergenicity of Foods" - QLK1-CT-2001-01239. 2001.
Ref Type: Report
304. Davis PJ, Williams SC: **Protein modification by thermal processing.** *Allergy* 1998, **53**:102-105.
305. Besler M, Steinhut H, Paschke A: **Stability of food allergens and allergenicity of processed foods.** *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2001, **756**:207-228.

306. Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S, Gonzalez-Mancebo E, Fernandez-Rivas M, Ree R, Mills ENC: **The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3.** *Allergy* 2005, **60**:1262-1268.
307. Bohle B, Zwoelfer B, Heratizadeh A, Jahn-Schmid B, Antonia YD, Alter M, Keller W, Zuidmeer L, van Ree R, Werfel T, Ebner C: **Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, **118**:242-249.
308. Sanchez-Monge R, Blanco C, Perales AD, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G: **Class I chitinases, the panallergens responsible for the latex-fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000, **106**:190-195.
309. Gruber P, Becker WM, Hofmann T: **Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, **53**:2289-2296.
310. Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP: **The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000, **106**:763-768.
311. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C: **Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, **112**:775-783.
312. Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Peruffo ADB, Giannattasio M: **IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen.** *Allergy* 2002, **57**:98-106.
313. Beyer KB, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA: **Effects of cooking methods on peanut allergenicity.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, **107**:1077-1081.
314. Chung SY, Champagne ET: **Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, **49**:3911-3916.
315. Mondoulet L, Paty E, Drumare MF, Ah-Leung S, Scheinmann P, Willemot RM, Wal JM, Bernard H: **Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins.** *J Agric.Food Chem.* 2005, **53**:4547-4553.
316. Naqpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Rao PV: **Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*).** *J Allergy Clin Immunol* 1989, **83**:26-36.

317. Bernhiselbroadbent J, Scanlon SM, Sampson HA: **Fish Hypersensitivity .1. Invitro and Oral Challenge Results in Fish-Allergic Patients.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1992, **89**:730-737.
318. Han GD, Matsuno M, Ikeuchi Y, Suzuki A: **Effects of heat and high-pressure treatments on antigenicity of beef extract.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2002, **66**:202-205.
319. Norgaard A, Bernard H, Wal JM, Peltre G, Skov IPS, Poulsen LK, Bindslevjensen C: **Allergenicity of individual cow milk proteins in DBPCFC-positive milk allergic adults.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1996, **97**:218.
320. Host A, Samuelsson EG: **Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. A double-blind placebo-controlled study in milk allergic children.** *Allergy* 1988, **43**:113-118.
321. Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Peruffo ADB, De Lazzari F, Curioni A: **Food allergy to wheat products: The effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, **49**:5668-5673.
322. Fiocchi A, Restani P, Bernardo L, Martelli A, Ballabio C, D'Auria E, Riva E: **Tolerance of heat-treated kiwi by children with kiwifruit allergy.** *Pediatric Allergy and Immunology* 2004, **15**:454-458.
323. Jedrychowski L, Wroblewska B: **Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation.** *Food and Agricultural Immunology* 1999, **11**:91-99.
324. Ehn BM, Allmere T, Telemo E, Bengtsson U, Ekstrand B: **Modification of IgE binding to beta-lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, **53**:3743-3748.
325. Fiocchi A, Restani P, Riva E, Mirri GP, Santini I, Bernardo L, Galli CL: **Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin.** *Allergy* 1998, **53**:798-802.
326. Dube M, Zunker K, Neidhart S, Carle R, Steinhart H, Paschke A: **Effect of technological processing on the allergenicity of mangoes (*Mangifera indica* L.).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, **52**:3938-3945.
327. Venkatachalam M, Teuber SS, Roux KH, Sathe SK: **Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, **50**:3544-3548.
328. Alvarez-Alvarez J, Guillaumon E, Crespo JF, Cuadrado C, Burbano C, Rodriguez J, Fernandez C, Muzquiz M: **Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, **53**:1294-1298.
329. Pecquet C, Lauriere M: **New allergens in hydrolysates of wheat proteins.** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2003, **43**:21-23.

330. Gu XL, Beardslee T, Zeece M, Sarath G, Markwell J: **Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2001, **126**:218-225.
331. Grimshaw KEC, King RM, Nordlee JA, Hefle SL, Warner JO, Hourihane JOB: **Presentation of allergen in different food preparations affects the nature of the allergic reaction - a case series.** *Clinical and Experimental Allergy* 2003, **33**:1581-1585.
332. Weangsripanaval T, Moriyama T, Kageura T, Ogawa T, Kawada T: **Dietary fat and an exogenous emulsifier increase the gastrointestinal absorption of a major soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice.** *Journal of Nutrition* 2005, **135**:1738-1744.
333. Mouecoucou J, Villaume C, Sanchez C, Mejean L: **Effects of gum arabic, low methoxy pectin and xylan on in vitro digestibility of peanut protein.** *Food Research International* 2004, **37**:777-783.
334. Nacer AS, Sanchez C, Villaume C, Mejean L, Mouecoucou J: **Interactions between beta-lactoglobulin and pectins during in vitro gastric hydrolysis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 52 (2) 355-360 2004, **52**:355-360.
335. Polovic N, Blanus M, Gavrovic-Jankulovic M, tanaskovic-Markovic M, Burazer L, Jankov R, Velickovic TC: **A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro.** *Clinical and Experimental Allergy* 2007, **37**:764-771.
336. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ: **Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia.** *Leuk Res* 1988, **12**:345-355.
337. Blom T, Huang RY, Aveskogh M, Nilsson K, Hellman L: **Phenotypic Characterization of Ku812, A Cell-Line Identified As An Immature Human Basophilic Leukocyte.** *European Journal of Immunology* 1992, **22**:2025-2032.
338. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu YL, Rottem M, Goff JP, Beaven MA, Rao VK, Metcalfe DD: **Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of Fc epsilon RI or Fc gamma RI.** *Leukemia Research* 2003, **27**:677-682.
339. Nilsson G, Blom T, Kushegullberg M, Kjellen L, Butterfield JH, Sundstrom C, Nilsson K, Hellman L: **Phenotypic Characterization of the Human Mast-Cell Line Hmc-1.** *Scandinavian Journal of Immunology* 1994, **39**:489-498.
340. Fukuda T, Kishi K, Ohnishi Y, Shibata A: **Bipotent cell differentiation of KU-812: evidence of a hybrid cell line that differentiates into basophils and macrophage-like cells.** *Blood* 1987, **70**:612-619.
341. Eccleston E, Leonard BJ, Lowe JS, Welford HJ: **Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin.** *Nat New Biol* 1973, **244**:73-76.

342. Seldin DC, Adelman S, Austen KF, Stevens RL, Hein A, Caulfield JP, Woodbury RG: **Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**:3871-3875.
343. Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP: **IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones.** *Eur J Immunol* 1981, **11**:317-323.
344. Gilfillan AM, Kado-Fong H, Wiggan GA, Hakimi J, Kent U, Kochan JP: **Conservation of signal transduction mechanisms via the human Fc epsilon RI alpha after transfection into a rat mast cell line, RBL 2H3.** *J.Immunol.* 1992, **149**:2445-2451.
345. Lowe J, Jardieu P, VanGorp K, Fei DT: **Allergen-induced histamine release in rat mast cells transfected with the alpha subunits of Fc epsilon RI.** *J.Immunol.Methods.* 1995, **184**:113-122.
346. Marchand F, Mecheri S, Guilloux L, Iannascoli B, Weyer A, Blank U: **Human serum IgE-mediated mast cell degranulation shows poor correlation to allergen-specific IgE content.** *Allergy.* 2003, **58**:1037-1043.
347. Takagi K, Nakamura R, Teshima R, Sawada J: **Application of human Fc epsilon RI alpha-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE.** *Biol.Pharm.Bull.* 2003, **26**:252-255.
348. Vogel L, Luttkopf D, Hatahet L, Haustein D, Vieths S: **Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system.** *Allergy.* 2005, **60**:1021-1028.
349. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D: **High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I.** *J.Immunol.* 1996, **157**:221-230.
350. Wantke F, MacGlashan DW, Langdon JM, MacDonald SM: **The human recombinant histamine releasing factor: functional evidence that it does not bind to the IgE molecule.** *J.Allergy Clin.Immunol.* 1999, **103**:642-648.
351. Kuster H, Zhang L, Brini AT, Macglashan DWJ, Kinet JP: **The Gene and Cdna for the Human High-Affinity Immunoglobulin-e Receptor Beta-Chain and Expression of the Complete Human Receptor.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**:12782-12787.
352. Dibbern DA, Jr., Palmer GW, Williams PB, Bock SA, Dreskin SC: **RBL cells expressing human Fc epsilon RI are a sensitive tool for exploring functional IgE-allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients.** *J.Immunol.Methods.* 2003, **274**:37-45.
353. Blanc F, Bernard H, Alessandri S, Bublin M, Paty E, Leung SA, Patient KA, Wal JM: **Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens.** *Mol Nutr Food Res, sous presse* 2008.

354. Barnett D, Howden ME: **Partial characterization of an allergenic glycoprotein from peanut (*Arachis hypogaea* L.).** *Biochim Biophys Acta* 1986, **882**:97-105.
355. van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LM: **Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model.** *Clin Exp.Allergy*. 2004, **34**:1422-1428.
356. Furlong TJ, DeSimone J, Sicherer SH: **Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, **108**:867-870.
357. Grassi J, Didierlaurent A, Stadler BM: **Quantitative determination of total and specific human IgE with the use of monoclonal antibodies.** *J Allergy Clin Immunol* 1986, **77**:808-822.
358. Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE: **Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media.** *J Immunol Methods* 1989, **123**:193-210.
359. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Feather-Stone RM: **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochem Pharmacol* 1961, **7**:88-95.
360. Wal JM, Bernard H, Yvon M, Peltre G, David B, Creminon C, Frobert Y, Grassi J: **Enzyme immunoassay of specific human IgE to purified cows' milk allergens.** *Food and Agricultural Immunology* 1995, **7**:175-187.
361. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
362. Dean TP, Clarke MCA, Hourihane JO, Dean KR, Warner JO: **Application of an electrophoretic methodology for the identification of low molecular weight proteins in foods.** *Pediatric Allergy and Immunology* 1996, **7**:171-175.
363. Hoffmann A, Jamin A, Foetisch K, May S, Aulepp H, Haustein D, Vieths S: **Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of beta-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Comparison with classical methods in allergen standardization.** *Allergy*. 1999, **54**:446-454.
364. Binaghi RA, Demeulemester C: **Influence of the medium on the heat and acid denaturation of IgE.** *J Immunol.Methods*. 1983, **65**:225-233.
365. Bjorck L, Kronvall G: **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.** *J Immunol* 1984, **133**:969-974.
366. Lagunoff D: **The mechanism of histamine release from mast cells.** *Biochem Pharmacol* 1972, **21**:1889-1896.

367. Razin E, Mencia-Huerta JM, Stevens RL, Lewis RA, Liu FT, Corey E, Austen KF: **IgE-mediated release of leukotriene C₄, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells.** *J Exp Med* 1983, **157**:189-201.
368. Demeulemester C, Weyer A, Peltre G, Laurent M, Marchand F, David B: **Thermoinactivation of human IgE: antigenic and functional modifications.** *Immunology*. 1986, **57**:617-620.
369. Rudolf MP, Vogel M, Kricek F, Ruf C, Zurcher AW, Reuschel R, Auer M, Miescher S, Stadler BM: **Epitope-specific antibody response to IgE by mimotope immunization.** *Journal of Immunology* 1998, **160**:3315-3321.
370. Dessaint JP, Labalette M: **IgE, a target molecule for the treatment of allergy?** *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 1998, **38**:870-877.
371. Lehmann K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Suhr M, Becker WM, Vieths S, Rosch P: **Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions.** *Biochem.J.* 2006, **395**:463-472.
372. Maeyama K, Hohman RJ, Metzger H, Beaven MA: **Quantitative relationships between aggregation of IgE receptors, generation of intracellular signals, and histamine secretion in rat basophilic leukemia (2H3) cells. Enhanced responses with heavy water.** *J Biol.Chem.* 1986, **261**:2583-2592.
373. Kaul S, Luttkopf D, Kastner B, Vogel L, Holtz G, Vieths S, Hoffmann A: **Mediator release assays based on human or murine immunoglobulin E in allergen standardization.** *Clin.Exp.Allergy*. 2007, **37**:141-150.
374. Ladics GS, van Bilsen JHM, Brouwer HMH, Vogel L, Vieths S, Knippels LMJ: **Assessment of three human FcepsilonRI-transfected RBL cell-lines for identifying IgE induced degranulation utilizing peanut-allergic patient sera and peanut protein extract.** *Regul Toxicol Pharmacol* 2008, **51**:288-294.
375. Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA: **Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk.** *Allergy*. 1996, **51**:412-416.
376. Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garoffo LP, Valentini S, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A: **Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry.** *Mol Nutr.Food Res*. 2004, **48**:363-369.
377. Gaudin JC, Rabesona H, Choiset Y, Yeretssian G, Chobert JM, Sakanyan V, Drouet M, Haertle T: **Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays.** *Clinical and Experimental Allergy* 2008, **38**:686-693.
378. van der Veen MJ, van Ree R, Aalberse RC, Akkerdaas J, Koopelman SJ, Jansen HM, van der Zee JS: **Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1997, **100**:327-334.

379. McDermott RA, Porterfield HS, El MR, Burks AW, Pons L, Schlichting DG, Solomon B, Redzic JS, Harbeck RJ, Duncan MW, Hansen KC, Dreskin SC: **Contribution of Ara h 2 to peanut-specific, immunoglobulin E-mediated, cell activation.** *Clin.Exp.Allergy*. 2007, **37**:752-763.
380. MacGlashan DJ, Lichtenstein LM: **Studies of antigen binding on human basophils. I. Antigen binding and functional consequences.** *J Immunol* 1983, **130**.
381. Sampson HA: **Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, **107**:891-896.
382. Magnusson CGM: **Major Differences in Specificity Among Naturally-Occurring Human IgG-Subclass Anti-IgE Autoantibodies.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1995, **95**:1011-1019.
383. Nawata Y, Koike T, Yanagisawa T, Iwamoto I, Itaya T, Yoshida S, Tomioka H: **Anti-IgE autoantibody in patients with bronchial asthma.** *Clin Exp Immunol* 1984, **58**:348-356.
384. Nawata Y, Koike T, Hosokawa H, Tomioka H, Yoshida S: **Anti-IgE autoantibody in patients with atopic dermatitis.** *J Immunol* 1985, **135**:478-482.
385. Iwamoto I, Nawata Y, Koike T, Tanaka M, Tomioka H, Yoshida S: **Relationship between anti-IgE autoantibody and severity of bronchial asthma.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989, **90**:414-416.
386. Jarzab J, Gawlik R: **Immune complexes IgE/IgG in airborne allergy: Increase during pollen season.** *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2000, **10**:24-29.
387. Carini C, Fratazzi C, Aiuti F: **Evidence for IgE immune complexes and distribution of IgG subclasses with anti-IgE activity in patients with atopic dermatitis.** *Clin Exp Allergy* 1991, **21**:481-487.
388. Scheuer A, Haas H, Schlaak M: **Prevalence and subclass distribution of IgG-anti-IgE autoantibodies in atopy and parasitosis.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991, **96**:271-276.
389. Lichtenstein LM, Kageysobotka A, White JM, Hamilton RG: **Anti-Human IgG Causes Basophil Histamine-Release by Acting on IgG-IgE Complexes Bound to IgE Receptors.** *Journal of Immunology* 1992, **148**:3929-3936.
390. Bruhns P, Fremont S, Daeron M: **Regulation of allergy by Fc receptors.** *Current Opinion in Immunology* 2005, **17**:662-669.
391. Carini C, Fratazzi C, Barbato M: **IgG autoantibody to IgE in atopic patients.** *Ann Allergy* 1988, **60**:48-52.
392. Hantusch B, Scholl I, Harwanegg C, Krieger S, Becker WM, Spitzauer S, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E: **Affinity determinations of purified IgE and IgG**

- antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: Discrepancy between IgE and IgG binding strength.** *Immunology Letters* 2005, **97**:81-89.
393. El-Khouly F, Lewis SA, Pons L, Burks AW, Hourihane JO: **IgG and IgE avidity characteristics of peanut allergic individuals.** *Pediatric Allergy and Immunology* 2007, **18**:607-613.
394. Christensen LH, Holm J, Lund G, Riise E, Lund K: **Several distinct properties of the IgE repertoire determine effector cell degranulation in response to allergen challenge.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, **122**:298-304.
395. Ballmer-Weber BK, Weber JM, Vieths S, Wuethrich B: **Predictive value of the sulfidoleukotriene release assay in oral allergy syndrome to celery, hazelnut, and carrot.** *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2008, **18**:93-99.
396. Erdmann SM, Heussen N, Moll-Sladowy S, Merk HF, Sachs B: **CD63 expression on basophils as a tool for the diagnosis of pollen-associated food allergy: sensitivity and specificity.** *Clinical and Experimental Allergy* 2003, **33**:607-614.
397. Li TM, Kontis KJ, Rance F, Abbal M, Vuitton DA: **Clinical evaluation of a new fully automated enzyme immunoassay for basophil histamine release in whole blood.** *Inflammation Research* 2000, **49**:S49-S50.
398. Adel-Patient K, Creminon C, Bernard H, Clement G, Negroni L, Frobert Y, Grassi J, Wal JM, Chatel JM: **Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine beta-lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice.** *J.Immunol.Methods* 2000, **235**:21-32.
399. Adel-Patient K, Creminon C, Boquet D, Wal JM, Chatel JM: **Genetic immunisation with bovine beta-lactoglobulin cDNA induces a preventive and persistent inhibition of specific anti-BLG IgE response in mice.** *International Archives of Allergy and Immunology* 2001, **126**:59-67.
400. Pradelles P, Grassi J, Maclouf J: **Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay.** *Anal.Chem.* 1985, **57**:1170-1173.
401. Antoine C, Maclouf J, Pradelles P: **Measurement of leukotrienes by enzyme immunoassays using acetylcholinesterase as label.** *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991, **21A**:319-322.

