

Structures des protéines impliquées dans les allergies alimentaires

Jean-Michel Wal

La prédiction et la prévention des allergies alimentaires sont devenues une contrainte de santé publique et un enjeu économique pour les industries agro-alimentaires. Un accroissement des manifestations d'allergies est observé en relation avec les modifications de comportements alimentaires et, notamment, la consommation d'aliments « non traditionnels » devenus disponibles en grande quantité, du fait de l'évolution des techniques de production ou du développement des échanges internationaux. Dès lors, une évaluation du risque allergique potentiel des produits est apparue nécessaire pour la protection des consommateurs ; un marché porteur s'est également ouvert pour le développement d'aliments dits hypo-allergéniques destinés aux groupes à risque, voire à l'ensemble de la population.

Cette démarche ne s'appuie pas pour l'instant sur des bases scientifiques très solides, car les mécanismes de l'allergie alimentaire sont mal connus et multifactoriels et leur physiopathologie est bien particulière. Deux phases décalées dans le temps sont nécessaires : une phase de sensibilisation, lors d'un premier contact avec l'antigène, avec induction de la synthèse et diffusion dans l'organisme d'anticorps spécifiques de la classe des

immunoglobulines E (IgE), puis, une phase de déclenchement, lors d'un contact ultérieur avec le même antigène ou avec une autre substance plus ou moins apparentée. Les manifestations sont variées dans leur gravité et dans leur localisation : digestives, mais surtout extradiigestives (cutanées, respiratoires), avec des relations doses-effets mal établies.

Parmi les facteurs intervenant dans la dérégulation d'une réponse immunitaire physiologique et sa déviation pathologique vers un état allergique, la composante génétique est essentielle. Un terrain favorable (dit atopique), héréditairement prédisposé, est nécessaire sans qu'une relation avec le complexe majeur d'histocompatibilité soit bien établie. L'incidence relativement faible et, surtout, la diversité des réponses allergiques liées à la variabilité génétique de la population rendent les modèles animaux peu pertinents. Les facteurs environnementaux (régime alimentaire, tabagisme...) sont également impliqués et peuvent avoir un effet adjuvant.

L'aliment intervient, bien évidemment, mais sa responsabilité propre dans ces interactions est difficile à isoler. Les allergènes alimentaires sont ubiquitaires ; ce sont très généralement des glycoprotéines que rien dans leur structure ne permet, *a priori*, de distinguer d'antigènes anodins. Les études visant à comprendre ce qui fait d'un antigène un allergène, de manière à définir et à maîtriser les relations structure-allergénicité, donnent actuellement lieu à de nombreux tra-

vaux. La structure des antigènes et/ou des allergènes alimentaires est souvent peu connue et cette notion est ambiguë. Les allergènes alimentaires sont généralement des glycoprotéines (c'est-à-dire des protéines possédant une ou plusieurs molécules de sucres en plus des acides aminés) dont la structure au sens strict se rapporte à la conformation spatiale de la molécule dans son milieu. Ceci implique la détermination de la séquence d'acides aminés, la mise en évidence des structures secondaires à l'intérieur de la molécule, la représentation de sa configuration stérique (structure tertiaire), voire des interactions intermoléculaires. En fait, c'est davantage à l'identification des épitopes que l'on se réfère quand on parle de structure des allergènes, qu'à la connaissance de la molécule pour elle-même. Les épitopes sont les portions de la molécule protéique (antigénique) qui se lient à l'anticorps spécifique et qui sont donc responsables de l'immunoréactivité. On considère parfois que ces structures sont définies, constantes, voire universelles et, une fois identifiées, qu'elles pourraient révéler le mécanisme de l'allergénicité et permettre sa suppression. Les épitopes peuvent être soit séquentiels, soit continus, correspondant à un fragment (peptide) de la séquence primaire de la molécule. Ils peuvent être conformationnels ou discontinus, c'est-à-dire correspondre à plusieurs fragments de la chaîne d'acides aminés, rapprochés les uns des autres par la conformation spatiale de la molécule. Leur taille est variable suivant les molécules et les méthodologies d'étude : elle est comprise entre 4-6 et 15-22 résidus d'acides aminés [1].

J.-M. Wal : Laboratoire d'immuno-allergie alimentaire, INRA-CEA, Service de pharmacologie et d'immunologie, CE Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

Tirés à part : J.-M. Wal

Glossaire

Structure des protéines

- La structure primaire est constituée par l'enchaînement « linéaire » des différents résidus d'acides aminés dont la composition et la séquence définissent la protéine.
- Les structures secondaire et tertiaire représentent l'organisation de la molécule protéique dans l'espace : repliements de la chaîne d'acides aminés, formation de liaisons intra-chaîne et acquisition de la configuration globale de la molécule.
- La structure quaternaire résulte des interactions entre différentes sous-unités ou entre les molécules de protéines.
- La glycosylation est une phase de maturation permettant la fixation de groupements sucrés sur la molécule de protéine déjà constituée, et aboutissant à la formation d'une glycoprotéine.
- Une glycoprotéine est une protéine qui contient, en plus des acides aminés qui la composent, des ramifications comportant des motifs sucrés.

Immunologie

- Au cours de la réponse immunitaire, différents types d'anticorps (IgM, IgG, IgA, IgE) peuvent être produits par l'organisme ; ils diffèrent par leur concentration, leur structure, leur localisation et leur fonction. La réaction allergique résulte d'une dérégulation de la réponse immunitaire avec une augmentation de la réponse de type IgE.
- Le fragment Fab d'un anticorps (immunoglobuline) est la partie de la molécule qui contient le site de reconnaissance spécifique d'un antigène et qui permet sa liaison à l'anticorps.
- Le complexe majeur d'histocompatibilité participe globalement à la préservation de l'intégrité du soi. Parmi les molécules qu'il exprime, certaines, dites de classe 2, sont des protéines qui interviennent dans les mécanismes de présentation de l'antigène au niveau des cellules immunocompétentes.
- Un haptène est une petite molécule, de faible poids moléculaire, incapable d'induire par elle-même une réponse anticorps mais qui peut être reconnue par un anticorps et donc se lier à son fragment Fab. Les xénobiotiques, qui sont des substances étrangères à l'organisme (additifs, médicaments, pesticides...), se comportent souvent comme des haptènes.
- Les techniques d'analyse immuno-chimiques utilisent les anticorps comme des outils de détection extrêmement spécifiques et sensibles. Le RAST® est une méthode commerciale de dosage des IgE spécifiques dirigée contre les allergènes les plus couramment rencontrés. Les techniques dites d'*immunoblotting* associent une méthode de séparation de molécules antigéniques suivant leurs caractéristiques physico-chimiques, le transfert sur un support adéquat par une technique d'empreinte, puis la détection, par des immuns sérums et/ou des anticorps spécifiques, des composés ainsi séparés.

Pour analyser ce qui fait d'une protéine un allergène [2, 3], quelques précisions sont nécessaires.

Immunogénicité, antigénicité et allergénicité sont trois activités qui ne se recouvrent pas complètement. L'immunogénicité est l'aptitude à induire la synthèse d'anticorps spécifiques, l'antigénicité est la capacité de la molécule à se lier à ces anticorps spécifiques (en majorité de la classe des immunoglobulines G), l'allergénicité peut se définir comme l'aptitude à induire, à être reconnu et à se lier à une classe particulière d'anticorps de type réaginique : les IgE. Il n'existe pas, *a priori*, de restriction isotypique due à l'antigène ; il y a cependant des exemples

où la spécificité et/ou l'affinité de la liaison aux IgG diffèrent de celles de la liaison aux IgE. Ainsi, en toute rigueur, l'allergène est la molécule se liant à une IgE spécifique et l'épitope allergénique est la partie limitée de la molécule se fixant à la partie liante (Fab) de la molécule d'IgE spécifique. Avec Aas [3] on parlera d'allergène majeur lorsque cette réaction se produit chez au moins 50 % des patients présentant les risques cliniques de l'allergie en question.

Le champ d'investigation est complexe en allergie alimentaire du fait de la grande variabilité des réactions aux substances les plus diverses, la molécule native n'étant pas forcément la forme la

plus réactogène. C'est ainsi que de simples manipulations ou préparations, comme l'épluchage ou le pressage, peuvent faire perdre l'allergénicité de la pomme de terre ou de la pomme ; des traitements thermiques (cuisson) ou les processus physiologiques (digestion) peuvent également, suivant les aliments et les individus, soit laisser l'allergénicité en état, soit faire disparaître des épitopes sensibles, soit même démasquer des épitopes nouveaux jusque-là inapparents.

La plupart des résultats disponibles sur la structure épitopique des antigènes et/ou des allergènes alimentaires ont été obtenue par analyses immuno-chimiques des aliments ou des protéines isolées avec des immuns sérums spécifiques. Dans l'idéal, il s'agit de sérums de patients allergiques (donc riches en IgE spécifiques), mais, bien souvent, ces études sont conduites avec des sérums d'animaux hyperimmunisés contenant surtout des immunoglobulines polyclonales de type G, ou même avec des anticorps monoclonaux de spécificité très étroite. Les antigènes et/ou les allergènes complexes, tout comme les aliments, peuvent être analysés par des techniques électrophorétiques (simples ou bidimensionnelles) permettant de séparer les différentes fractions antigéniques suivant leur masse et/ou leur point iso-électrique. Les antigènes, une fois isolés et purifiés, peuvent être hydrolysés par différentes protéases (pepsine, trypsine, chymotrypsine notamment) ; les peptides issus de ces hydrolyses sont séparés, identifiés et testés. Les gènes correspondant à ces protéines peuvent également être clonés et les antigènes produits par génie génétique. Des techniques de mutagenèse dirigées peuvent les modifier de façon ponctuelle ou avec des délétions plus ou moins importantes, de manière à connaître l'influence des structures modifiées sur l'immuno-réactivité de la molécule. La connaissance de la structure primaire de la protéine-allergène permet également de réaliser la synthèse chimique de peptides dont les séquences se chevauchent partiellement, ce qui permet de reconstituer la chaîne d'acides aminés de la protéine et ainsi de tester la réactivité de différents fragments.

En présence de l'antigène ou de ses fragments immunoréactifs, les anticorps spécifiques forment des immuns complexes qui sont visualisés ou mesurés. Leur mise en évidence peut se faire par marquage à l'iode 125 ou par un traceur enzymatique en milieu solide sur des gels électrophoré-

tiques, soit directement, soit après transfert sur des films de nitrocelluloses selon les techniques dites de *blotting* (figure 1). La mesure de la liaison peut également se faire en milieu liquide par des techniques de type RAST® (*radio allerge sorbent test*) ou des techniques enzymo-immunologiques dérivées du même principe. L'antigénicité/allergénicité d'une substance sera alors mesurée par sa capacité à se lier à l'anticorps spécifique (IgG ou IgE) correspondant ou, au contraire (dans le cas d'un fragment peptidique par exemple), par sa capacité à inhiber la liaison de l'antigène natif à son anticorps. Malgré la variabilité des instruments d'observation et de détection que sont les anticorps, ou peut-être grâce à elles, les techniques immunochimiques ont apporté des données sur la structure des principaux allergènes alimentaires.

Les protéines allergènes alimentaires complets

Les allergènes du poisson : l'allergène M de la morue

L'allergène M de la morue (purifié ou synthétisé) est l'allergène majeur, reconnu chez la plupart des patients sensibles au poisson et entraînant des réactions très positives dans les tests de sensibilisation passive de Prausnitz-Küstner et dans les tests de type RAST®. Cet allergène est stable à la chaleur, résistant à la protéolyse et à la dénaturation. Il est reconnu également par les IgG, mais cette reconnaissance n'est pas spécifique et couvre d'autres protéines que l'allergène majeur. De plus, certaines IgG reconnaissent les mêmes régions de la protéine que l'IgE, mais d'autres pas. L'allergène M fait partie de la famille des protéines musculaires des vertébrés liant le calcium et les parvalbumines appartenant au groupe des calmodulines. Il est composé de 113 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire d'environ 12 kD. Sa structure montre une forte homologie de séquence avec les parvalbumines d'autres espèces de poisson que la morue, expliquant ainsi les réactivités croisées parfois observées. L'analyse de la diffraction aux rayons X a permis de déterminer la structure secondaire d'un

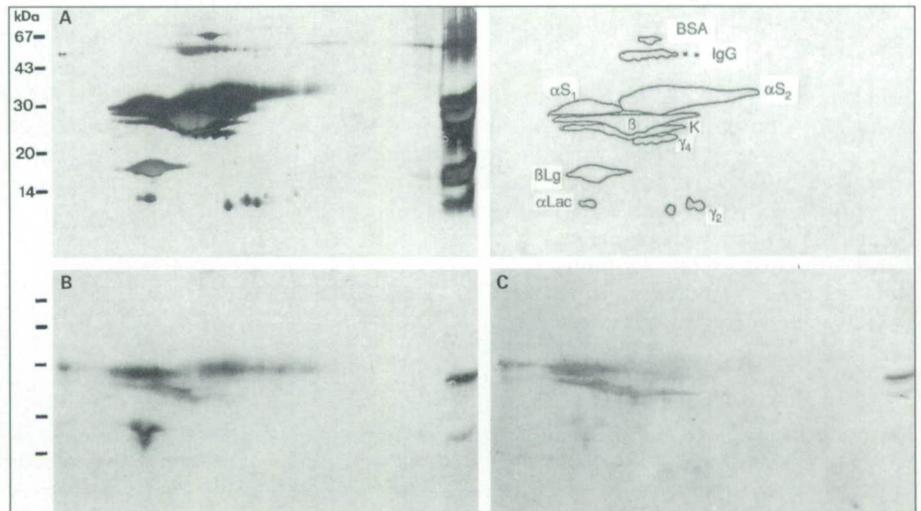


Figure 1. Analyse des antigènes et allergènes du lait par électrophorèse en deux dimensions et immuno-empreintes (d'après Brodard *et al.* [39]). A : profil obtenu après une première séparation suivant la charge, par iso-électrofocalisation en conditions dénaturantes, suivie d'une seconde séparation suivant la masse molaire, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), puis coloration des protéines à l'argent (BSA : sérum albumine bovine ; αS_1 , αS_2 , β , κ , $\gamma 1$, $\gamma 2$: différentes fractions de caséine ; βLg : β -lactoglobuline ; αLac : α -lactalbumine ; IgG : immunoglobuline G bovine). B et C : immuno-empreintes obtenues après reconnaissance des allergènes et des antigènes par les IgE (B) et les IgG (C) d'un patient allergique aux protéines du lait.

Figure 1. Two dimensional immunoelectrophoretic analysis of milk antigens and allergens [39]. 2D electrophoresis combined isoelectric focusing under denaturing conditions and polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). This enabled separation of complex protein mixtures according to charge and molecular weight. Figure 1-A shows the 2D silver-stained protein patterns : BSA : bovine serum albumin ; αS_1 , αS_2 , β , κ , $\gamma 1$, $\gamma 2$: different casein fractions ; βLg : β lactoglobulin ; αLac : α -lactalbumin ; IgG : bovine immunoglobulin G. Figures 1-B and C show immunoprints obtained from a milk-allergic patient serum after allergen and antigen recognition and binding by IgE and IgG, respectively.

représentant de cette famille de protéines qui se compose de trois domaines homologues constitués d'hélices et séparés par une boucle [4].

Les structures immunoréactives de l'allergène M ont été étudiées par les équipes de Aas [2, 3] et de Elsayed [4] en combinant plusieurs approches : modification de certains résidus et étude de la réactivité des molécules dérivées, ainsi que celle d'un grand nombre de peptides obtenus par hydrolyse ménagées ou de peptides synthétiques analogues. Trois sites de liaison ont ainsi été mis en évidence.

Les essais effectués à partir de peptides de synthèse ont permis de montrer que l'immunoréactivité du fragment 49-64 du domaine CD est déterminée par trois térapeptides (D-E-L-K), (D-E-D-K) et (D-E-L-K) disposés dans un arrangement répétitif et espacés par des bras de six résidus d'acides aminés (D : acide aspartique, E : acide glutamique, L : leucine, K : lysine).

Le fragment 88-103, liant le calcium et appartenant au domaine EF, possède 40 % d'homologie avec le peptide 49-64 ;

en revanche, il ne comporte pas le térapeptide terminal caractéristique. Il a été synthétisé et s'est montré porteur d'un site hapténique, monovalent, pouvant bloquer, mais non déclencher, la réaction allergique. En effet, deux épitopes sont nécessaires pour provoquer le pontage des IgE et la dégranulation des mastocytes observés dans les tests biologiques. Toutefois, un seul épitope suffit pour rendre compte du pouvoir immunogène, une protéine endogène pouvant servir de « vecteur » (*carrier*) éventuel.

L'allergène M est particulièrement résistant à la chaleur et ses peptides tryptiques restent capables de lier les IgE spécifiques, conservant ainsi leur allergénicité au cours d'une protéolyse ménagée. Il faut également remarquer que la modification de la structure secondaire de l'allergène M, par modification de l'arginine en position 75 ou par retrait de deux ions Ca^{++} , ne diminue que peu son allergénicité. Au contraire, l'acétylation ou le remplacement de la tyrosine 30, sans effet sur la conformation, diminue beaucoup l'allergénicité.

Les allergènes de blanc d'œuf

Le blanc d'œuf est un des aliments les plus fréquemment impliqués dans les réactions d'hypersensibilité, notamment chez l'enfant où il peut déclencher d'importantes réactions de dermatites atopiques. Il est composé de cinq protéines principales : l'ovalbumine, l'ovotransferrine, l'ovomucoïde, le lysozyme et l'ovomucine, représentant respectivement 58, 14, 11, 3,5 et 2 % du poids sec [3]. Les trois premières protéines ont été reconnues comme allergènes majeurs après séparation par électrophorèse ou iso-électrofocalisation, puis transfert et visualisation par *immunoblot* [5]. Le rôle du lysozyme en tant qu'allergène mineur est discuté. L'ovalbumine et, surtout, l'ovomucoïde sont stables à la chaleur.

La structure primaire de l'ovalbumine (OVA) est connue. L'OVA purifiée montre une grande affinité pour les IgE spécifiques de sérums de patients allergiques au blanc d'œuf. Sa protéolyse par le bromure de cyanogène, qui coupe la chaîne protéique aux résidus méthionine, donne quatre fragments, tous capables de lier les IgE spécifiques. La dénaturation thermique de l'OVA ne modifie pas directement son antigénicité et la réactivité de la protéine dénaturée est semblable à celle de la protéine native. L'action de la trypsine ne supprime pas l'allergénicité, mais une hydrolyse limitée par la pepsine détruit les structures antigéniques de la molécule. Les épitopes allergéniques de l'OVA sont donc principalement déterminés par leur séquence primaire (épitopes séquentiels ou continus) [3]. Là encore, la synthèse de peptides mimant la séquence de la protéine et l'étude de leur activité *in vitro* et/ou *in vivo* sur les IgG et IgE spécifiques, ont permis de préciser les structures immuno-réactives de la molécule. Elsayed *et al.* [4] ont ainsi montré que le décapeptide N terminal, capable de lier les IgE mais ne donnant pas lieu à des réactions cutanées, comprenait vraisemblablement un épitope monovalent (hapténique). Le peptide 323-339 a été reconnu responsable d'environ un tiers de la réponse de cellules T de souris *Balb c* à la protéine intacte et pourrait ainsi être structurellement proche du peptide fabriqué par les cellules présentatrices de l'antigène et interagissant avec les molécules du système majeur d'histo-compatibilité durant le remaniement de l'OVA [6]. De plus, cette région de la molécule a été montrée

immunogène chez le lapin et contiendrait donc un épitope allergique et antigénique reconnu par les IgE humaines et les IgG de lapin. Un certain nombre de petits peptides (huit à treize acides aminés) de la portion 11-122 de l'OVA ont également montré des activités antigéniques et/ou allergéniques.

Les allergènes de légumineuse

• Soja

Les réactions allergiques aux protéines de soja ont été bien établies à la suite de l'utilisation de préparations à base de soja en remplacement du lait de vache chez des enfants intolérants. Il s'en est parfois suivi des urticaires, des troubles gastro-intestinaux, des crises d'asthme, voire un choc anaphylactique [7].

De nombreuses protéines impliquées dans l'allergie alimentaire ont été identifiées dans les fractions 2S, 7S et 11S des globulines. L'inhibiteur trypsique est considéré comme très allergène : c'est une protéine de 21 kD qui a été reconnue dans la fraction 2S. La fraction 7S contient également des allergènes fréquemment reconnus, notamment une sous-unité de la β -conglycinine qui est une glycoprotéine trimérique de 53 kD de masse moléculaire. Le troisième allergène majeur est la glycinine (fraction 11S), grosse molécule globulaire de 309 à 363 kD selon la variété de soja. C'est un dodécamère composé de six sous-unités basiques et de six sous-unités acides [8]. Toutes ces protéines donnent lieu à des réponses positives en RAST® ou en RAST-inhibition et présentent de très importantes réactions croisées [8]. Les allergies respiratoires causées par l'exposition aux poussières de farine de soja ne semblent pas, dans tous les cas, être dues aux mêmes allergènes, bien que des fragments apparentés à ceux décrits aient parfois été évoqués [9].

• Arachide

L'allergie à l'arachide affecte un nombre de plus en plus important d'individus. La gravité des chocs auxquels elle donne lieu ainsi que sa fréquence sont en augmentation. Les constituants responsables appartiennent, là encore, à la fraction protéique et non à la fraction lipidique [10, 11].

Les protéines de réserve, majoritairement présentes dans la graine d'arachide, sont

subdivisées en arachine et conarachine qui s'associent réversiblement en solution. L'arachine se présente sous forme d'une association de formes monomériques de 170 kD et existe sous deux formes polymorphiques (A et B) qui peuvent être dissociées en un nombre variable de sous-unités de masse moléculaire s'étalant entre 20 kD et 71 kD. La conarachine comporte deux constituants (I et II) de masse moléculaire respectivement de 142 et de 295 kD, relativement résistants à la chaleur et à l'hydrolyse enzymatique, notamment par les enzymes digestives. On les retrouve aussi bien dans les graines crues que grillées où elles conservent la même allergénicité. La *concanavalline A-reactive glycoprotein*, forme monomérique de 63 kD, a également été reconnue allergénique par les tests *in vitro* (RAST®) et *in vivo* (tests cutanés, sensibilisation passive) [12]. Nommée Ara h I, elle a été clonée [13]. Parmi le grand nombre d'allergènes détectés sinon caractérisés, une protéine de 17 kD (Ara h II) a été identifiée comme allergène majeur et caractérisée [14].

Les graines de légumineuses sont riches en protéines de réserve, peut-être moins hétérogènes que ne le sont les protéines animales ; elles sont résistantes aux enzymes digestives. Les quantités de telles protéines, susceptibles d'être « biodisponibles » pour le système immunitaire et ainsi de provoquer une réponse allergique, peuvent dès lors être relativement importantes, ce qui peut expliquer la sévérité des réactions d'hypersensibilité aux graines de légumineuses. Par ailleurs, l'élimination des groupements glucidiques diminue légèrement l'allergénicité de ces protéines, mais ne la supprime pas. Des phénomènes de sensibilisation croisée peuvent apparaître entre différents aliments de la famille des légumineuses (arachide, soja, pois, lentilles...). Des homologies dans la structure de leurs protéines peuvent expliquer la présence d'épitopes communs ou suffisamment proches pour être reconnus par les IgE d'un même patient allergique. Il n'est cependant pas établi que cette immuno-réactivité croisée, observée *in vitro*, puisse être responsable de réactions allergiques lors de l'ingestion de ces composés [15].

Protéines du lait de vache

L'allergie au lait de vache représente une part importante des allergies alimen-

taires. Il était classiquement admis que, dans les allergies au lait de vache, l'allergène majeur était la β -lactoglobuline. Cette protéine est en effet naturellement absente du lait de femme ; elle est résistante aux pH acides et sa structure est relativement préservée lors de la digestion, permettant un passage éventuel dans le sang sous forme intacte. Les résultats récents infirment cette vision un peu finaliste et montrent que, dans les cas d'allergie au lait, les sensibilités aux différentes protéines sont largement distribuées [16, 17] (figure 2).

Le lait de vache contient environ 30 à 35 grammes de protéines par litre. L'action d'une enzyme, la chymosine (présure) ou l'acidification à pH 4,6 du lait permettent d'obtenir deux fractions : le lactosérum (environ 20 % des protéines) et le caillé qui contient les caséines représentant environ 80 % des protéines du lait. Cette fraction est constituée par quatre protéines (αS_1 , αS_2 , β et κ -caséines) codées par des gènes différents portés par le même chromosome. Les autres formes de caséine sont dérivées de modifications post-traductionnelles comme la phospho-

rylation, la glycosylation ou l'hydrolyse partielle [18, 19].

Chaque caséine représente une entité chimique bien définie, mais les différentes caséines sont en fait associées sous formes d'agréats stables, les micelles, en suspension dans la phase aqueuse ou lactosérum. La proportion en poids des caséines αS_1 , αS_2 , β et κ dans les micelles est relativement constante (3:1:3:1). En revanche, leur répartition n'est pas uniforme à l'intérieur des différents types de micelles. Les submicelles seraient constituées d'une partie centrale hydrophobe et d'une couche périphérique hydrophile où se concentrent spécifiquement les fragments polaires des molécules de κ -caséines. La part restante de cette couche superficielle est occupée par les fragments polaires des autres caséines (αS_1 , αS_2 , β) et notamment des résidus phosphosérine. Les submicelles s'agrègent en micelles du fait des interactions entre le phosphate de calcium colloïdal et les groupements phosphosérine des caséines αS_1 , αS_2 , β . La proportion de κ -caséine présente en surface des micelles augmente donc avec la taille de ceux-ci [18].

La fraction protéique du lactosérum est constituée essentiellement de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, de sérum-albumine, d'immunoglobulines et d'autres protéines minoritaires en poids, comme la lactoferrine, mais pouvant être importantes sur le plan physiologique ou fonctionnel. Enfin, l'hétérogénéité des protéines du lait est compliquée par leur polymorphisme génétique qui fait que, selon les cas, elles se présentent sous forme de plusieurs variants séparables et identifiables par électrophorèse. Les variants se caractérisent par des substitutions ponctuelles d'acides aminés ou par des délétions de fragments peptidiques plus ou moins importants de la séquence primaire [19].

• Protéines du lactosérum

Les allergènes majeurs du lactosérum sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine qui, contrairement aux caséines, sont des protéines globulaires. Elles sont synthétisées par la glande mammaire, alors que la sérum albumine provient du sang.

– α -lactalbumine

Il s'agit d'une petite molécule d'environ 14 kD qui possède un site de liaison du

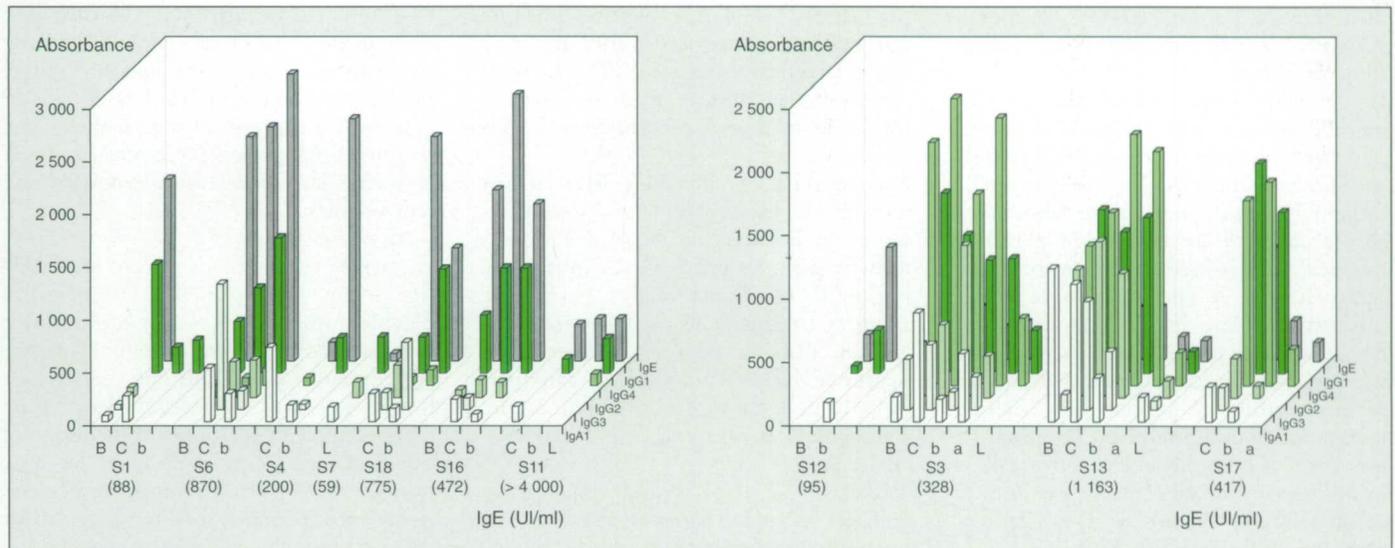


Figure 2. Réponses des anticorps (IgE et sous-classes d'IgG et d'IgA) spécifiques des différentes protéines purifiées dans une population de patients allergiques au lait de vache (d'après Wal *et al.* [40]). (B : sérum albumine bovine ; C : caséine entière ; b : β -lactoglobuline ; a : α -lactalbumine ; L : lactoferrine ; Sn : sérum du patient n. Les profils montrent la grande variabilité individuelle de la réponse IgE, IgG et IgA, tant en spécificité qu'en intensité. Les protéines majoritaires en masse (caséine entière, β -lactoglobuline) se révèlent être également des allergènes majeurs (en fréquence et par l'intensité de la réponse IgE qu'ils induisent). Cependant, des protéines présentes en quantité très faible, comme la sérum albumine et surtout la lactoferrine, se révèlent également être des allergènes importants. Ce sont même parfois les seuls reconnus par certains patients, chez lesquels ils entraînent les manifestations cliniques d'une allergie alimentaire.

Figure 2. IgE, IgA and IgG subclass responses to cow's milk proteins in milk-allergic patients [40]. B : bovine serum albumin ; C : whole casein fraction ; b : β -lactoglobulin ; a : α -lactalbumin ; L : lactoferrin. The patterns show the high individual variability in IgE, IgG and IgA responses, both with respect to specificity and intensity. The main proteins by weight (whole casein, β -lactoglobulin) also seem to be major allergens (*i.e.* in frequency and intensity of the IgE response they induce). However, proteins present in very low quantities, *e.g.* serum albumin and especially lactoferrin, may also be important allergens. These are sometimes the only ones recognized by patients in whom they cause clinical food-allergy manifestations.

calcium de haute affinité stabilisant sa structure secondaire. Composant régulateur du système enzymatique de la galactosyl transférase responsable de la synthèse du lactose [20], elle possède 40 % d'homologie de séquence avec le lysozyme du blanc d'œuf et sa structure tridimensionnelle est similaire. Elle ne donne pourtant pas de réaction croisée avec le lysozyme, de sorte que les déterminants antigéniques majeurs ne semblent donc pas portés par les séquences communes.

Une analyse théorique fondée sur les profils d'hydrophilicité de la molécule, qui présente deux pics au niveau des résidus 5 (lysine) et 15 (leucine), a suggéré que le site antigénique majeur pouvait être porté sur le peptide 5-18 qui possède une arginine [21]. C'est une des régions où la différence de séquence est la plus importante entre les α -lactalbumines bovine et humaine, qui possèdent de fortes homologies. Ce peptide isolé s'est effectivement révélé avoir une capacité de liaison aux anticorps spécifiques.

En revanche, une autre étude [22] conclut que l'antigénicité semble localisée pour une grande part (20-25 %) au niveau du peptide constitué de la boucle 60-80, qui possède un pont disulfure, elle-même rattachée par un autre pont disulfure au peptide 91-96. La même structure est retrouvée dans l' α -lactalbumine de chèvre.

En dehors de l'étude de Adams [21], très peu de travaux ont été menés sur les structures immuno-réactives pour les IgE spécifiques humaines. Les résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire sur la capacité de liaison de peptides dérivés de l' α -lactalbumine aux IgE montrent que, en fait, les épitopes reconnus peuvent être linéaires et différents des structures antigéniques prédites par modélisation moléculaire ou déduites de résultats obtenus grâce à des sérums d'animaux hyperimmunisés. De plus, un fort degré d'homologie avec l' α -lactalbumine humaine n'est pas une garantie de « non-réactivité » pour la région correspondante de la molécule.

– β -lactoglobuline (β Lg)

Elle se présente naturellement sous forme d'un dimère de 36 kD. Chaque sous-unité correspond à un polypeptide de 162 résidus. La molécule possède deux ponts disulfures et une cystéine libre. La β Lg est stable à l'acidification, résistante à la dénaturation à pH 2 et peut donc demeurer intacte après la digestion gastrique. La β Lg peut lier une grande variété de molécules hydrophobes [20].

La β Lg existe sous forme de deux variants principaux A et B. Les seules différences résident au niveau des résidus 64 et 118, respectivement aspartate et valine dans la β Lg A, glycine et alanine dans la β Lg B [19]. Bien que la structure des deux variants soit très similaire, l'intensité et la durée de la réponse IgE chez le rat sensibilisé par injection péritonéale sont plus importantes dans le cas de la β Lg B. En revanche, chez des cobayes immunisés par voie orale, la réponse IgG₁ ou IgG₂ est plus forte contre la β Lg A que contre le variant B [23].

L'analyse épitopique de la β Lg a donné lieu à de très nombreuses études réalisées à l'aide d'anticorps (IgE ou IgG) provenant d'animaux sensibilisés expérimentalement. Les doses et les modes d'administration diffèrent d'un travail à l'autre et, surtout, correspondent rarement aux conditions d'une sensibilisation par voie digestive chez des patients atopiques humains. Cet outil imparfait donne des résultats très variables, voire contradictoires. Malgré la faible homologie de séquence, un fort pourcentage de réactions croisées est observé avec l' α -lactalbumine. Les profils d'hydrophilicité de la β Lg laissent prévoir l'antigénicité du peptide 124-134. Ce peptide possède une des rares séquences communes avec l' α -lactalbumine ; Adams [21] le rend responsable de plus de 60 % de la liaison totale de la β Lg à ses anticorps spécifiques.

Mizumachi *et al.* [24], identifient six sites de liaison des anticorps spécifiques de la molécule de β Lg. L'utilisation de peptides synthétiques mimant la région C terminale leur a permis de montrer l'antigénicité du fragment 149-162 et, dans ce peptide, de mettre en évidence le rôle majeur de l'histidine 161, dont la substitution fait perdre au fragment la plus grande partie de son antigénicité.

Takahashi *et al.* [25] décrivent quatre épitopes, dont le fragment 149-162. Les quatre fragments gardent leur immuno-réactivité dans la molécule de β Lg réduite et S-carboxyméthylée, c'est-à-dire après perte de sa configuration spatiale. Ils concluent que les structures secondaires et tertiaires n'influencent pas la liaison des anticorps et que l'antigénicité des fragments identifiés ne peut pas s'expliquer uniquement par leur position sur des structures en coudes entre les feuillettes β et par leur exposition vers l'extérieur de la molécule. Ils montrent

également que des peptides tryptiques isolés gardent leur antigénicité, contrairement aux résultats antérieurs de Huang *et al.* [26]. Ils confirment cependant certaines observations d'Otani [27, 28] qui identifie de nombreuses régions antigéniques-allergéniques, notamment la séquence 146-162 commune à plusieurs auteurs ; ils notent également que quatre régions gardent leur réactivité dans la β Lg réduite et dénaturée.

Ces résultats sont, la plupart du temps, obtenus en présence de quantités importantes de fragments peptidiques et il est généralement bien admis que l'hydrolyse des protéines du lait réduit considérablement leur allergénicité [17, 25]. C'est pourquoi il est intéressant de rappeler les travaux de Haddad *et al.* [29] qui ont montré, sur dix patients allergiques au lait de vache, que les IgE spécifiques reconnaissent mieux des digestats enzymatiques (pepsiques ou pepsiques + tryptiques) de la β Lg (10 patients/10) que la molécule intacte (4/10) et en concluent que les processus digestifs démasquent des épitopes allergéniques nouveaux.

• Les caséines

Les structures primaires et une partie des structures secondaire et tertiaire des caséines sont connues. Comme les caséines ne peuvent être cristallisées, leur structure secondaire est approchée par modélisation moléculaire. Les études de séquences antigéniques sont réalisées par les méthodes présentées ci-dessus, pour lesquelles les réserves déjà évoquées restent valables.

– α ₁ caséine

La caséine α ₁ est constituée d'une chaîne polypeptidique de 199 résidus d'acides aminés de masse moléculaire d'environ 24 kD. Le principal variant (B) contient huit résidus phosphates sous forme de sérines phosphorylées ; sept d'entre eux sont regroupés dans une portion acide de la molécule entre les résidus 43 et 80, qui comporte également douze groupements carboxyliques. Les groupements phosphates semblent localisés au niveau de coudes β , le repliement de la molécule les amenant en étroite proximité les uns des autres pour former un domaine très hydrophile limité spatialement par les prolines 27 et 29 [20, 30].

Les nombreux travaux d'Otani *et al.* [28, 31] sur les peptides issus de l'hydrolyse de la caséine α ₁ par le bromure de cyanogène et la trypsine mettent en avant le rôle de la région phosphorylée dans

l'antigénicité et décrivent six fragments allergéniques et/ou antigéniques dont le principal est le peptide 61-123. Le rôle du peptide 133-151, déjà décrit par Otani, est confirmé [32] mais les peptides trypsiques ou chymotrypsiques comportant les séquences de résidus phosphosérines seraient sans activité immunoréactive.

– Caséine β

La caséine β possède cinq principaux variants génétiques et peut se présenter avec différents niveaux de phosphorylation [20]. C'est une molécule hydrophobe qui se caractérise par ses propriétés amphipatiques ; sa structure comporte un grand domaine très hydrophobe, représentant environ les deux tiers de la molécule dans la partie C terminale, bien séparé d'un plus petit domaine polaire comprenant les 21 premiers résidus d'acides aminés N terminaux (environ 1/10 de la molécule). La séquence de la caséine β est riche en proline et les sites de phosphorylation sont concentrés au niveau du fragment 15-19 [20]. Sa structure antigénique et allergénique [28, 33] a été étudiée par la méthodologie déjà décrite : préparation de fragments peptidiques déterminés et étude de leur capacité de liaison à des anticorps spécifiques anti β -caséine native. Ces anticorps sont soit des IgG d'animaux sensibilisés, soit, dans de plus rares cas, des IgG ou des IgE de patients allergiques. Les résultats sont très variables suivant les conditions opératoires (tableau 1).

On peut noter que toute l'antigénicité de la molécule native de β -caséine est retrouvée dans la somme des antigénicités de ses fragments d'hydrolyse au bromure de cyanogène. Cette additivité fait conclure qu'il existe au moins six sites antigéniques sur la molécule de β -caséine et que ces épitopes sont séquentiels. Par ailleurs, tous les peptides ne sont pas reconnus de la même manière selon les anticorps : pour certains peptides, la réactivité des IgG de lapin et des IgG ou des IgE humaines est différente.

– αS_2 et κ -caséines

Ces deux caséines, mineures en terme quantitatif, ont donné lieu au même type d'étude de la part des mêmes auteurs, avec des conclusions analogues. Nos propres résultats font apparaître que la quasi-totalité des patients allergiques à la caséine entière ont des IgE spécifiques dirigées contre chacune des caséines isolées et purifiées. Il s'agit vraisemblablement ici de phénomènes de co-sensibilisation à ces protéines appartenant à une

Tableau 1

Réactivité de différentes classes d'anticorps anti- β -caséine bovine contre quelques-uns des peptides isolés après hydrolyse

Peptide	IgG lapin	IgG humaine	IgE humaine
1-25	+	-	-
1-60	+	-	+
26-60	+	-	-
61-93	+	-	-
29-93	+	-	+
94-102	+	-	-
103-109	+	-	-
110-144	+	-	+
132-144	-	-	+
157-185	+	+	+
186-209	-	+	+

Reactivity of different classes of anti-bovine β casein antibodies against some of the isolated peptides after hydrolysis of β casein

même famille et rassemblées dans les produits laitiers. La présence simultanée de plusieurs antigènes dans un même aliment peut ainsi expliquer, pour une part, les multisensibilités souvent observées en allergie alimentaire. Ce n'est pas toujours le cas et, souvent, des phénomènes de sensibilités croisées à des allergènes provenant d'une même famille botanique, mais également d'espèces animales ou végétales éloignées, ont été décrits. Cette immunoréactivité croisée entre antigènes non apparentés, détectée par des tests *in vitro* de type RAST, semble toutefois ne pas donner une image fidèle de la spécificité des allergies alimentaires. C'est ainsi que Sampson [34] note que, dans les cas de dermatite atopique, le seul test qui selon lui apparaît fiable dans l'investigation des allergies et intolérances alimentaires, à savoir le test de provocation orale en double aveugle contre placebo, fait apparaître l'allergie alimentaire comme très spécifique. Bien que présentant des RAST et/ou des *prick tests* positifs à de nombreux aliments, la plupart de ces patients ne révèlent en fait de symptômes allergiques qu'à un seul (46 %) ou à deux (37 %) aliments lors d'un test de provocation orale correctement exécuté ; cinq aliments paraissent rendre compte de la quasi-totalité (82 %) des allergies alimentaires chez 220 enfants atteints de dermatite atopique : ce sont les œufs, le lait, l'arachide, le soja et le poisson, qui interviennent respectivement pour 41, 15, 13,7 et 6 % des réactions cliniques observées.

Conclusion

Il n'y a pas de réponse simple, universelle et définitive à la question de Aas [2] : « qu'est-ce qui fait d'une protéine un allergène ? ». Certaines analogies de séquence ont pu être retrouvées dans des allergènes différents et sont suspectées d'être des sites préférentiels de liaisons aux anticorps, mais aucune structure n'a pu être décrite comme étant isolément et intrinsèquement allergénique. Par ailleurs, le dénombrement et l'identification des épitopes allergéniques sur une molécule varient avec la méthodologie et les réactifs utilisés.

Les protéines vecteurs de xénobiotiques potentiellement allergènes

Les xénobiotiques, qui sont généralement des molécules de faible poids moléculaire, se comportent comme des haptènes et l'acquisition de leur pouvoir immunogène est conditionnée par la liaison préalable à une macromolécule, généralement protéique. Cette condition nécessaire a conduit certains à reconnaître une présumption de risque allergène dans la présence, au sein des molécules des xénobio-

Summary

Immunoreactive structures in food proteins

J.-M. Wal

Eggs, milk, peanuts, soya and fish are the foods that are most often implicated in food allergies. Allergens within these products are glycoproteins with small structures on their surfaces made up of a few amino acid residues. These structures are responsible for immunoreactivity, and especially for binding with specific IgE antibodies. These allergenic determinants, or epitopes, can be continuous, i.e. formed from a fragment of the primary sequence of the protein, or discontinuous. In the latter case, they are made up of several fragments of the amino acid chain, which are linked because of the spatial configuration of the molecule. Identification of the characteristic repetitive structure of allergen M, the major allergen from codfish, is an important step towards establishing general structure/allergenicity relationships, which could be useful for pinpointing and eliminating allergenic fractions in food proteins.

Analysis of the above-mentioned allergenic foods highlighted the presence of a wide variety of allergens. Several proteins can be involved within a single food. For each protein, functional epitopes were mapped through immunochemical analyses, and they seem to be numerous and structurally varied. The wide variability in the observed responses and their heterogeneity suggest that an allergenic epitope can be characterized by its own structure, and also in terms of its interactions with its environment and with the organism with it comes into contact.

Proteins are complete allergens themselves, and can indirectly take part in allergic-type reactions induced by xenobiotics for which they act as carriers. Xenobiotics, e.g. food additives, pesticides, veterinary drug residues or industrial protein processing impurities, are generally low molecular weight molecules. They perform as haptens; acquisition of an immunogenic potential is dependent on preliminary binding to a

macromolecule, generally a protein. For some authors, this essential condition indicates an allergic risk, when electrophilic groups are present in xenobiotic molecules. After activation, these groups could covalently bind with available basic amino acid residues at suitably presented sites in the protein molecule. Combined chemical and immunochemical analyses are thus useful for evaluating the risk of immunological disorders associated with the reactivity of xenobiotic molecules, but alone they have little predictive value. The protein must have a sequence and structure that facilitates accessibility, presentation and activation of reactive groups, and energy, at these sites.

It is difficult to determine the immunoreactive structures of protein molecules. Those that have been identified are often analogous and homologous, even among distantly related proteins. However, to date no universal structures have been found that would clearly establish a close relationship between structure and allergenicity. Conversely, a variability factor seems to be linked to the human consumer, in addition to the structural component corresponding to essential chemical constraints of antigen-antibody binding. In characterizing the epitope, it is essential to establish the association between the potentially reactive structure, which is well defined and stable (associated with the protein, and thus with a standardized product), and the corresponding binding region of its IgE antibody, which can be highly variable in terms of affinity and specificity because of the genetic heterogeneity of the population. When factors of individual variation are generally taken into account it is very difficult to come up with an overall strategy for predicting and preventing food allergy risks for a new additive, a non-traditional food, or a product formed through a novel process, that are intended for a wide consumer population.

Cahiers Agricultures 1996 ; 5 : 403-13.

tiques, de groupements électrophiles pouvant, après activation, donner lieu à une liaison covalente avec des résidus é aminés de protéines. L'exemple de la pénicilline et de la formation de son métabolite allergène (le conjugué benzyl-pénicilloyl-albumine) en donne une illustration.

Mécanisme de la formation du métabolite allergène dans l'exemple de la pénicilline

Le groupement benzyl-pénicilloyl (BPO), issu de la pénicilline par rupture

du cycle β -lactame, se fixe aux protéines et, notamment, à la sérum-albumine par formation d'une liaison covalente entre le groupement carbonyle activé de la pénicilline et un groupement aminé libre de la protéine. Les conjugués ainsi formés ont perdu tout pouvoir antibactérien, mais sont doués de potentialité antigé-

nique, les groupements BPO étant dès lors considérés comme les déterminants allergéniques majeurs de la pénicilline [35]. Les accidents allergiques qui peuvent survenir après pénicillinothérapie ou après ingestion d'aliments (lait notamment) provenant d'animaux traités, et qui pourraient donc encore contenir des résidus, sont ainsi principalement dus à des conjugués benzyl-pénicilloyl (BPO)-protéines.

Modulation et spécificité de la liaison albumine - BPO

La liaison du BPO à l'albumine sérique présente des caractéristiques et des effets très différents, aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif. La majeure partie des BPO fixés l'est en des sites enfouis au sein de la structure tertiaire de l'albumine. Ils sont ainsi masqués pour leurs anticorps spécifiques, ne peuvent manifester en l'état leur activité antigénique et, dès lors, ne sont pas « biodisponibles » sur le plan immunotoxicologique. Ils ne recouvrent cette biodisponibilité qu'après « démasquage », lors du renouvellement de la molécule d'albumine par exemple [36]. Le taux d'haptènes fixés et leur présentation sur la molécule protéique porteuse influent sur l'allergénicité. Or, l'état nutritionnel ou la variation de paramètres nutritionnels durant un cycle biologique peuvent modifier les modalités de cette liaison. Une augmentation du taux d'acides gras non estérifiés plasmatiques, qui sont des ligands endogènes physiologiques de la sérum-albumine, augmente à la fois le taux de fixation des BPO sur la molécule d'albumine et leur biodisponibilité pour les anticorps spécifiques [37].

Ainsi, des facteurs environnementaux comme l'alimentation (ou encore la thérapeutique ou différentes formes de pollution ou de contamination) peuvent agir sur la conformation de la molécule protéique porteuse de l'haptène. Ils interviennent alors à la fois sur l'activation des sites récepteurs (en favorisant la formation de la liaison covalente) et sur la présentation de ces sites, donc des déterminants antigéniques qui s'y fixent. Ils modulent ainsi, par action sur la molécule porteuse, le potentiel allergénique du xénobiotique.

La structure primaire de la sérum-albumine fait apparaître environ soixante résidus d'acides aminés basiques suscep-

tibles de se lier au BPO. Or les études, tant *in vivo* que *in vitro*, réalisées dans des conditions de température et de pH « physiologiques », n'ont jamais fait apparaître que quelques groupes BPO (1 à 3) réellement fixés sous forme de conjugués albumine-BPO. Seuls quelques résidus d'acides aminés susceptibles de réagir semblent donc pouvoir être impliqués dans l'attaque nucléophile de la pénicilline et dans le mécanisme de son aminolyse.

L'hydrolyse de conjugués albumine-BPO par le bromure de cyanogène fait apparaître quatre chaînes peptidiques. L'étude de la réactivité de ces fragments envers des anticorps spécifiques anti-BPO indique que des groupements BPO étaient présents sur trois d'entre eux : les fragments C₁₂₄₋₂₉₈, A₃₂₉₋₄₄₆ et A₄₄₇₋₅₄₈. Le fragment N terminal (B₁₋₁₂₃) de l'albumine n'apparaît jamais pénicilloylé. L'hydrolyse trypsique de ces fragments, suivie de la séparation des peptides pénicilloylés par couplage en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) d'une colonne d'immuno-affinité et d'une colonne de phase inverse, a permis de purifier six peptides porteurs de groupements BPO. Ces peptides ont été identifiés par leur séquence et le site de fixation du BPO a été formellement localisé par dosage immunochimique à chaque étape du séquençage. Six sites de liaison ont ainsi été identifiés, tous sur des résidus lysine : il s'agit des lysines 190, 195, 199, 432, 541, 545 [38]. Ces six sites sont constants, quel que soit le conjugué ; ce sont vraisemblablement les seuls, car ils représentent environ 80 % de la quantité totale de BPO présente sur les molécules de conjugué initial. Les trois d'entre eux situés sur le fragment C sont localisés sur une zone particulièrement réactive de l'albumine, à la jonction des domaines 1 et 2. Cette région est impliquée dans la liaison d'autres ligands : la lysine 199, notamment, est un site de glycosylation et de fixation de l'acide acétylsalicylique.

L'explication de ce faible nombre de sites réactifs pour la liaison du BPO (6 sur 60 potentiels) peut s'appuyer sur leurs homologies de séquences. Pour la plupart d'entre eux, ils font intervenir une séquence Ser-X-X-Lys où la lysine réactive est séparée d'une sérine par deux résidus d'acides aminés ; cette configuration est celle où, dans une structure en hélice α , lysine et sérine sont le plus proche. On peut donc envisager un mécanisme réactionnel tel que la formation d'un ester intermédiaire et instable d'acide

pénicilloïque avec le groupement hydroxyl de la sérine, suivie d'une transacylation vers le groupement ϵ aminé de la lysine voisine.

Interprétation des résultats

Les résultats peuvent suggérer quelques pistes dans la prédiction et la gestion du risque allergique lié aux xénobiotiques. Le groupement BPO est le principal déterminant antigénique de la pénicilline. Sa liaison covalente à une protéine, l'albumine notamment, aboutit à la formation de l'allergène majeur. Une telle liaison ne met pas en jeu des mécanismes chimiques simples tous prévisibles, *a priori*, par l'examen des groupements réactifs de la molécule. Elle implique des séquences bien définies et relativement universelles, puisqu'on les retrouve chez les différentes protéines qui interagissent avec la pénicilline pour fixer le groupement BPO. Les motifs ainsi identifiés permettent de localiser, sur la molécule de la protéine porteuse, un certain nombre de sites de liaison des déterminants antigéniques qui peuvent, dans le cas de l'allergie à la pénicilline, s'apparenter à des épitopes séquentiels ou conformationnels. Ils mettent en évidence le rôle de la structure primaire de la protéine, mais aussi de ses structures tertiaire et quaternaire et, donc, l'effet de facteurs du milieu.

Certains ne sont pas exclusifs de la pénicilline puisque la lysine 199, notamment, est un site de glycosylation, d'acétylation, de liaison à l'aspirine. Ils sont peu nombreux, concentrés dans de très petites régions où ils sont rapprochés, ce qui limite leur accessibilité aux anticorps.

La possibilité théorique de formation d'une liaison covalente entre un haptène électrophile (comme le sont nombre de xénobiotiques) et une protéine (par exemple le sérum albumine, protéine majoritaire du sérum) est une condition nécessaire à l'apparition de l'allergénicité. *A fortiori*, l'observation expérimentale d'une telle liaison et l'obtention de conjugués covalents *in vitro*, leur séparation, leur purification et la détermination du taux d'haptène fixé sont des présomptions fortes d'un risque allergène. Ce ne sont cependant pas des conditions suffisantes et les modalités de l'établissement d'une liaison covalente entre un tel haptène et une protéine sont en réalité complexes et peut-être peu fréquentes.

Les approches chimiques et immuno-chimiques permettent un début d'évaluation du risque d'apparition de désordres immunologiques liés à la réactivité de la molécule de xénobiotique, mais elles ne peuvent avoir, à elles seules, de valeur prédictive universelle.

Conclusions générales

Au sein des protéines, des structures discrètes, généralement de petites tailles et de séquences bien définies, sont responsables de l'allergénicité. Ce sont les épitopes dans le cas des allergènes vrais et, dans le cas des protéines porteuses, des sites de liaison covalents avec l'haptène. Dans chaque cas, la structure de la protéine assure au niveau de ces sites une séquence et une conformation telles que les critères d'accessibilité, de présentation et d'activation des groupements réactionnels, ainsi que de niveaux énergétiques nécessaires pour la formation de la liaison soient satisfaits.

La détermination de ces structures est complexe. Celles qui ont été identifiées font souvent apparaître des analogies ou des homologies d'une protéine à une autre, même éloignée. Cependant, aucune structure universelle n'a jusqu'ici été reconnue, qui permettrait d'établir de manière univoque et formelle les bases d'une stricte relation structure-allergénicité. Au contraire, il apparaît, à côté de la composante structurale correspondant aux contraintes chimiques de la liaison antigène-anticorps, un facteur de variabilité lié au terrain. Il y a une nécessaire association dans la définition et la détermination de l'épitope entre la structure potentiellement réactive, bien définie et stable, liée à la protéine (et donc à un produit standardisé) et la partie liante correspondante de son anticorps IgE, éminemment variable en affinité comme en spécificité du fait de l'hétérogénéité de la population (et donc liée à la réponse individuelle d'un consommateur). C'est cette prise en compte de la manière la plus large possible des facteurs de variation individuels qui rend difficile et délicate une stratégie d'approche globale de prédiction et de prévention des risques d'allergie alimentaire pour un nouvel additif, un aliment non traditionnel ou un produit issu d'un nouveau procédé, destinés à de larges groupes de populations ■

Références

1. Van Regenmortel MH. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immunol Today* 1989 ; 10 : 266-92.
2. Aas K. What makes an allergen an allergen ? *Allergy* 1978 ; 33 : 3-14.
3. Aas K. Chemistry of food allergens. In : Hamburger RN, ed. *Food intolerance in infancy : allergology, immunology and gastroenterology, carnation nutrition education series*. Vol. 1. Los Angeles : Raven Press, 1989 : 9-21.
4. Elsayed S, Apold J, Holen E, Vik H, Florvaag E, Dybendal T. The structural requirements of epitopes with IgE binding capacity demonstrated by three major allergens from fish, egg and tree pollen. *Scan J Clin Lab Invest* 1991 ; 51 (suppl. 204) : 17-31.
5. Holen E, Elsayed S. Characterization of four major allergens of hen eggwhite by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoradiography. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990 ; 91 : 136-41.
6. Johnsen G, Elsayed S. Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin. III. MHC Ia-binding peptide (OA 323-339) interacts with human and rabbit specific antibodies. *Mol Immunol* 1990 ; 27 : 921-7.
7. Eastham EJ. Soy protein allergy. In : Hamburger RN, ed. *Food intolerance in infancy : allergology, immunology and gastroenterology, carnation nutrition education series*. Vol. 1. Los Angeles : Raven Press, 1989 : 223-36.
8. Burks AW, Brooks J, Sampson HA. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1988 ; 81 : 1135-42.
9. Bush RK, Schroeckenstein D, Meier-Davis S, Balmes J, Rempel D. Soybean flour asthma : detection of allergens by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1988 ; 82 : 251-5.
10. Taylor SL, Busse WW, Sachs MI, Parker JL, Yunginger JW. Peanut oil is not allergenic to peanut-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1981 ; 68 : 372-5.
11. Hatahet R, Kanny G, Moneret-Vautrin DA. L'allergie à la cacahuète chez le nourrisson : le danger de certains laits maternisés. *Rev Fr Allergol* 1992 ; 33 : 86-7.
12. Nordlee JA, Taylor SL, Sones RY, Yunginger JW. Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J Allergy Clin Immunol* 1981 ; 68 : 376-82.
13. Burks AW, Cockrell G, Stanley JS, Helm RM, Bannon GA. Recombinant peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 1715-21.
14. 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* 1995 ; 90 : 962-9.
15. Bernishel-Broadbent J, Sampson HA. Cross allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1989 ; 83 : 435-40.
16. Bleumink E, Young E. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int Arch Allergy Immunol* 1968 ; 34 : 521-43.

17. Baldo BA. Milk allergies. *Aust J Dairy Technol* 1984 ; 39 : 120-8.
18. Schmidt DG. Association of caseins and casein micelle structure. In : Fox PF, ed. *Developments in dairy chemistry-1*. London, New York : Applied Science Publishers, 1982 : 61-86.
19. Grosclaude F. Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. *INRA Prod Anim* 1988 ; 1 : 5-17.
20. Swaisgood HE. Chemistry of milk proteins. In : Fox PF, ed. *Developments in dairy chemistry-1*. London, New York : Applied Science Publishers, 1982 : 1-60.
21. Adams SL, Barnett D, Walsh BJ, Pearce RJ, Hill DJ, Howden ME. Human IgE-binding synthetic peptide of bovine β -lactoglobuline and α -lactalbumin. *In vitro* cross-reactivity of the allergens. *Immunol Cell Biol* 1991 ; 69 : 191-7.
22. Hopp TP, Woods KR. Immunochemical studies on α -lactalbumin. *Mol Immunol* 1982 ; 19 : 1453-63.
23. Malik Z, Bottomley R, Austen B. Allergenicity properties of the genetic variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1988 ; 86 : 245-8.
24. Mizumachi K, Kurisaki J, Tsujio NM. Modification of antigenic structure in the C-terminal region of bovine β -lactoglobulin. *XXIII Int Dairy Congress 1990*. Int Dairy Federation 1990 : 284.
25. Takahashi T, Yamanchi K, Kaminogawa S. Comparison between the antigenicity of native and unfolded β -lactoglobulin. *Agric Biol Chem* 1990 ; 54 : 591-607.
26. Huang S, Coleman JW, Stanworth DR. Investigation of the allergenicity of β -lactoglobulin and its cleavage fragments. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1985 ; 78 : 337-44.
27. Otani H, Hosono A. Antigenic reactive regions of S-carboxymethylated β -lactoglobulin. *Agric Biol Chem* 1987 ; 51 : 531-6.
28. Otani H, Dong XY, Hara T, Kobayashi M, Kayahari H, Hosono A. Specificities to cow milk proteins of human serum antibodies from clinically allergic patients. *Milchwissenschaft* 1989 ; 44 : 267-70.
29. Haddad ZH, Kalra V, Verma S. IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of β -lactoglobulin : significance in food hypersensitivity. *Annals Allergy* 1979 ; 42 : 368-71.
30. Kumosinsky TF, Brown EM, Farrel HM. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins : α S₁-casein. *J Dairy Sci* 1990 ; 74 : 2289-95.
31. Otani H, Hosono A. IgM and IgG antibody responses of rabbits to cow α S₁-casein estimated on the basis of peptide fragments derived from α S₁-casein. *Milchwissenschaft* 1991 ; 46 : 95-7.
32. Ametani A, Kaminogawa S, Shimizu M, Yamanchi K. Rapid screening of antigenically reactive fragments of α S₁-casein using HPLC and ELISA. *J Biochem* 1987 ; 102 : 421-5.
33. Otani H, Dong XY, Hosono A. Antigen specificity of antibodies raised in rabbits injected with a chymotrypsin casein digest with Mw less than 1000. *Jap J Dairy Food Sci* 1990 ; 39 : 31-7.
34. Sampson HA. Eczema and food hypersensitivity. In : Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA, eds. *Food allergy adverse reactions to foods and food additives*. Boston : Blackwell Scientific Publications, 1991 : 113-28.
35. Levine BB, Ovary Z. Studies on the mechanism of the formation of penicillin antigen III.

The N - (D-a-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med* 1961 ; 114 : 875-904.

36. Wal JM. Enzymatic unmasking for antibodies of penicilloyl residues bound to albumin. *Biochem Pharmacol* 1980 ; 29 : 195-9.

37. Wal JM. Incidence de l'état nutritionnel sur l'allergénicité d'un xénobiotique : la pénicilline. *Cah Nutr Diet* 1988 ; XXIII : 291-3.

38 Yvon M, Anglade P, Wal JM. Identification of the binding sites of benzyl penicilloyl, the allergenic metabolite of Penicillin, on the serum albumin molecule. *FEBS Lett* 1990 ; 263 : 237-40.

39. Brodard V, Bernard H, Wal JM, David B, Peltre G. Two-dimensional analysis of cow's milk allergens with the IPG-DALT technique. In : McGhee J, Mestecky J, Tlaskalova H, Sterzl J, eds. *Recent advances in mucosal immunology, Series advances in experimental medicine and biology*. New York : Plenum Press, 1995 : 875-8.

40 Wal JM, Bernard H, Creminon C, Hamberger C, David B, Peltre G. Cow's milk allergy : the humoral immune response to eight purified allergens. In : McGhee J, Mestecky J, Tlaskalova H, Sterzl J, eds. *Recent advances in mucosal immunology, Series advances in experimental medicine and biology*. New York : Plenum Press, 1995 : 879-81.

Résumé

Les œufs, le lait, l'arachide, le soja et le poisson sont les aliments les plus incriminés dans les allergies alimentaires. Les allergènes qui les composent sont des glycoprotéines à la surface desquelles de petites structures de quelques résidus d'acides aminés sont responsables de l'immunoréactivité et, notamment, de la liaison à des anticorps spécifiques de la classe des IgE. Ces déterminants allergéniques ou épitopes peuvent être continus, constitués par un fragment de la séquence primaire de la protéine, ou bien discontinus. Ils correspondent alors à plusieurs fragments de la chaîne d'acides aminés, rapprochés les uns des autres par la conformation spatiale de la molécule. L'identification de la structure répétitive caractéristique de l'allergène M, allergène majeur de la morue, a suscité l'espoir d'établir des relations structure-allergénicité de portée générale, permettant de prédire, puis d'éliminer, les fractions allergènes d'une protéine alimentaire. Les protéines sont en elles-mêmes des allergènes complets ; elles peuvent également participer indirectement à des réactions de type allergique induites par des xénobiotiques à qui elles servent alors de vecteurs, de porteurs (*carrier*). Les xénobiotiques (additifs, médicaments, résidus ou impuretés de fabrication d'une protéine) sont généralement des molécules de faible poids moléculaire qui se comportent comme des haptènes : l'acquisition d'un pouvoir immunogène est conditionnée par la formation préalable d'une liaison covalente avec des résidus aminés, disponibles en des sites de la molécule protéique convenablement présentés.

Rectificatif

Rachel Cattet, auteur de l'article « *Calliandra calothyrsus* comme protection des andosols à la Réunion », paru dans *Cahiers Agricultures* 1996, numéro 3, volume 5, pages 157 à 160, précise qu'il reprend les résultats obtenus lors d'un stage de DESS effectué au Cirad-forêt Saint-Pierre sous la responsabilité de J. Tassin, représentant exécutif du Cirad-forêt à la Réunion.