



Devenir des allergènes dans le tube digestif[☆]

Fate of food allergens in the digestive tract

K. Adel-Patient^{*}, H. Bernard, J.-M. Wal

UR496, laboratoire d'immuno-allergie alimentaire, INRA, iBiTec-S/SPI, bâtiment 136, CEA de Saclay,
91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

Résumé

Bien que la voie de sensibilisation aux allergènes alimentaires reste un sujet de débat, il est admis que la voie digestive et le système lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal (GALT) jouent un rôle majeur. Dans les conditions physiologiques, du fait des attaques acides et enzymatiques lors de la digestion gastrique et intestinale, très peu de protéines alimentaires sont absorbées intactes et sont supposées parvenir au GALT sous une forme immunologiquement active. Il est apparu cependant que certains allergènes alimentaires sont, au moins partiellement, résistants à la digestion, ce qui leur permettrait d'atteindre les sites d'induction d'une réponse immunitaire et d'entraîner la sensibilisation allergique chez le sujet atopique. De nombreux modèles de digestibilité *in vitro* ont été développés afin de confirmer la résistance des allergènes alimentaires à la digestion et d'établir si cette propriété est réellement la cause de leur potentiel allergénique. La résistance à la digestion fait notamment partie des études requises pour l'évaluation de l'allergénicité des protéines issues des nouveaux aliments tels que les organismes génétiquement modifiés. Cependant, certaines protéines alimentaires fortement allergéniques sont rapidement et complètement dégradées lors de la digestion et, à l'inverse, des protéines non allergènes peuvent être très résistantes à la digestion. Néanmoins, des fragments peptidiques, de tailles variées, issus de la dégradation de la protéine lors de la digestion, peuvent conserver tout ou partie de l'allergénicité de la protéine native. Il semble également que d'autres facteurs interviennent et interagissent pour faire de certaines protéines alimentaires des allergènes puissants au niveau du tractus gastro-intestinal. Tout d'abord, il faut considérer l'allergène au sein de l'aliment : les caractéristiques physicochimiques de la matrice alimentaire influencent le devenir de l'allergène et peuvent modifier l'allergénicité de la protéine isolée. Par ailleurs, différentes études suggèrent que des caractéristiques propres à un allergène alimentaire peuvent influencer de manière spécifique sur son mode et sa voie d'absorption par la muqueuse intestinale et ainsi déterminer *in fine* le type de réponse immunitaire induite. Il faut également noter qu'il existe des mécanismes d'absorption en amont du tractus gastro-intestinal, au niveau de la cavité buccale, pouvant expliquer la survenue très rapide de symptômes suite à l'ingestion de certains allergènes alimentaires.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Mechanisms by which food allergens sensitize atopic individuals still remain unclear. However, most of them are thought to sensitize via the gastrointestinal tract. Due to the very acidic conditions in the stomach and the intense proteolysis occurring in the stomach and in the intestine, only small amounts of intact or immunologically active proteins are taken up by the gut mucosa. This suggested that food allergens are, at least partially, resistant to gastro-duodenal digestion in order to be able to sensitize the mucosal immune system. As a result, several *in vitro* models have been developed to evaluate the stability of potential allergens to digestion. Indeed, resistance to digestion is part of the premarketing allergenicity assessment of newly expressed proteins in genetically modified crops. However, some food allergens are rapidly and extensively degraded during digestion, whereas some other food proteins that are resistant to digestion are not allergenic. It has been shown that degradation products, i.e. peptide fragments of various sizes, produced during the digestion of a protein may keep (part of) the allergenicity of the native protein. In addition, other factors may interact as to make a food protein an allergen, such as the structure and composition of the food matrix, technologic processing including cooking of the whole food that contains the allergens. Some studies also suggested that the biological property of a protein to be an allergen can influence its mode and route of transport across the intestinal epithelial barrier, which may have a profound impact on the immune

[☆] Conférence donnée au troisième congrès francophone d'allergologie.

^{*} Auteur correspondant.

Adresse e-mail : karine.patient@cea.fr (K. Adel-Patient).

responses thus generated. It is noteworthy that a pregastric absorption also occurs, i.e. in the oral cavity, which explains the occurrence of symptoms few minutes after ingestion of food allergens.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergènes alimentaires ; Digestion gastro-intestinale ; Absorption ; Immunité mucosale ; Tolérance/sensibilisation

Keywords: Food allergens; Gastrointestinal digestion; Absorption; Mucosal immunity; Tolerance/sensitisation

1. Introduction

Les protéines alimentaires ingérées n'ont pas pour vocation de pénétrer intactes et en masse dans l'organisme : elles sont vouées à être intensivement modifiées et dégradées afin de traverser la muqueuse intestinale sous forme d'acides aminés, de di- ou de tri-peptides, fournissant ainsi l'essentiel des apports azotés nécessaires à l'organisme. Cependant, il a été démontré depuis longtemps qu'une faible part des protéines alimentaires ingérées se retrouve intacte dans la circulation sanguine. L'absorption de protéines alimentaires entières est donc un processus physiologique normal [1,2], dont le rôle immunitaire et/ou nutritionnel est méconnu. Par ailleurs, des peptides suffisamment grands pour être immunogènes sont générés dans la lumière intestinale et permettent l'induction de réponses immunitaires appropriées au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi, une tolérance est induite envers les protéines alimentaires et les bactéries de la flore commensale, tandis qu'une réponse immunitaire défensive est instaurée contre les agents pathogènes. Ce processus est le garant de l'homéostasie de l'organisme et constitue un niveau de protection de son intégrité face aux agressions ayant lieu au niveau de l'intestin, i.e., la plus grande surface de contact de l'organisme avec le monde extérieur. En marge de ces phénomènes physiologiques normaux, certaines protéines alimentaires peuvent induire une sensibilisation, c'est-à-dire la production d'IgE spécifiques, chez des sujets atopiques. Il semble donc que, comparés à des protéines banales, les allergènes alimentaires possèdent des propriétés intrinsèques et un devenir particulier dans le tractus gastro-intestinal leur donnant le pouvoir de sensibiliser l'organisme. Dans cette revue, nous nous proposons donc d'apporter quelques éléments de réponse et de réflexion quant au devenir des allergènes alimentaires dans le tube digestif.

1.1. La digestion des protéines alimentaires dans le tractus gastro-intestinal

Les protéines alimentaires subissent un processus de dégradation intense au cours de leur transit dans le tractus gastro-intestinal (TGI). L'amorce de la digestion protéique se déroule dans l'estomac, sous l'action de la pepsine, protéase acide qui clive la protéine en des sites spécifiques variés, essentiellement au niveau des acides aminés aromatiques. Cette attaque enzymatique, en conditions acides, peut durer entre quatre et six heures, temps que met l'estomac à se vider après un repas. Cependant, les liquides et petites particules mélangés au suc gastrique sont régulièrement projetés dans le duodénum, par pulses d'environ 3 ml, au rythme des contractions de l'estomac. Les aliments progressent ensuite dans l'intestin

grêle, lieu le plus important pour la digestion et l'absorption. L'entrée du digestat gastrique dans le duodénum induit la libération du suc pancréatique, contenant des amylases, des protéases (notamment trypsine, chymotrypsine et carboxypeptidases), des lipases et nucléases. Le suc pancréatique contient par ailleurs des ions bicarbonates, permettant de neutraliser l'acidité gastrique. La bile est également déversée au niveau duodénal, permettant l'émulsion des lipides et favorisant leur digestion. La paroi intestinale libère/contient également des enzymes permettant la digestion des sucres (lactases, amylases, sucrases) et protéines (amino-, carboxy- et di-peptidases). Les différentes protéases mises en jeu au cours de la digestion gastro-intestinale n'agissent pas de la même manière, permettant soit une dégradation séquentielle (amino-, carboxy-peptidases), soit une coupure sur des sites spécifiques (en C-terminal de résidus lysine ou arginine pour la trypsine par exemple) : leurs actions complémentaires et synergiques permettent ainsi une dégradation très efficace des protéines.

L'absorption des produits de la digestion se déroule tout le long de l'intestin grêle par transport actif ou par diffusion. Les protéines alimentaires sont essentiellement absorbées sous forme d'acides aminés ou de di- ou tri-peptides, puis drainées vers le foie sous cette forme via la veine porte. En théorie, à l'extrémité de l'iléon, seules des substances non digestibles (fibres essentiellement) et de l'eau sont présentes. Ces matières résiduelles entrent dans le gros intestin où elles sont fermentées par une microflore anaérobie diverse et abondante, pouvant métaboliser les nutriments résiduels et synthétiser quelques vitamines : l'absorption dans le colon se limite aux vitamines qui y sont produites.

Le péristaltisme intestinal et la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal limite le contact de protéines ou de fragments antigéniques avec l'épithélium intestinal. L'absence de transporteurs adéquats au niveau des entérocytes et l'impossibilité de franchir les jonctions serrées intercellulaires réduisent encore la probabilité d'absorption des protéines alimentaires peu ou pas digérées.

À la naissance cependant, et durant quelques jours pendant la maturation du système digestif, les nouveau-nés ont la capacité d'absorber des protéines entières, permettant notamment l'acquisition d'une immunité passive par absorption des immunoglobulines (Ig) du colostrum. Des conditions pathologiques peuvent également conduire à une augmentation de la perméabilité intestinale et donc au passage d'antigènes non ou peu dégradés. C'est le cas par exemple après une réaction d'hypersensibilité immédiate intestinale, durant laquelle la réaction locale conduit à une augmentation de la perméabilité intestinale permettant le passage d'autres antigènes que l'allergène sensibilisant et déclenchant qui sont présents en

même temps que lui [3,4]. Cette situation facilite la sensibilisation à ces antigènes et explique en partie les sensibilisations alimentaires multiples. Certains composants bioactifs de l'aliment, telle que la saponine issue de végétaux, peuvent également agir directement sur la muqueuse intestinale et augmenter sa perméabilité [5].

Dans les conditions physiologiques normales, les protéines alimentaires sont donc largement dénaturées et dégradées du fait de l'acidité gastrique et des attaques enzymatiques survenant dans l'estomac et l'intestin. Dans la plupart des cas, ces attaques détruisent les épitopes immunogéniques et conduisent finalement à une « ignorance immunitaire ». L'importance de cette dégradation dans la prévention de l'allergie alimentaire a ainsi été démontrée chez la souris suite à l'administration de protéines de poisson en présence ou non d'antiacides, la neutralisation de l'acidité gastrique conduisant à une sensibilisation des animaux [6].

1.2. Un système immunitaire aux aguets...

Si l'intestin permet la fourniture en nutriments nécessaires à l'organisme, il représente également la plus grande surface de contact avec le monde extérieur. L'interaction entre les systèmes immunitaires inné et spécifique a permis au cours de l'évolution le développement de mécanismes de défense efficaces contre les pathogènes, tout en permettant une tolérance face aux antigènes alimentaires et face à la grande diversité des bactéries de la flore intestinale.

Les sites d'induction d'une réponse immunitaire spécifique intestinale sont les follicules du *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT) : follicules lymphoïdes dispersés dans la muqueuse ou organisés au niveau des plaques de Peyer (PP). À ce niveau, les follicules sont recouverts d'un épithélium spécialisé, dépourvu de villosités, ou *Follicle Associated Epithelium* (FAE), contenant des cellules épithéliales particu-

lières, les cellules *Microfold* M (Fig. 1). Ces cellules permettent le passage transmuqueux des macromolécules intactes, des pathogènes ou des particules présents dans la lumière intestinale, et les délivrent après transport transépithélial aux cellules dendritiques et macrophages sous-jacents. Ce transport spécifique par les cellules M serait une étape clé dans l'induction d'une réponse locale et systémique spécifique [7]. Différentes populations de cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigènes, ont été identifiées dans la lamina propria au niveau des PP, où elles sont attirées par des chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales du FAE [8,9]. Ces cellules activent spécifiquement les lymphocytes T auxiliaires (ou *T helper*, Th) présents dans les PP. La sécrétion de cytokines par les Th permet l'activation des lymphocytes B, la production d'anticorps et la commutation isotypique vers les IgA. La maturation en plasmocytes sécrétant des IgA spécifiques de haute affinité se fait au cours d'une migration hors des follicules, un passage dans la circulation sanguine, puis un retour dans la *lamina propria*, lieu de la sécrétion des IgA. L'exclusion immunitaire est notamment assurée par la sécrétion de ces anticorps dans la lumière intestinale, permettant la neutralisation et l'élimination des pathogènes avant leur entrée dans l'organisme.

Des cellules dendritiques dispersées le long de l'intestin, au sein de la *lamina propria*, sont par ailleurs responsables de la surveillance et de l'échantillonnage permanent des antigènes solubles présents dans la lumière intestinale (Fig. 1), et de leur transport au niveau des ganglions mésentériques (*Mesenteric Lymph Nodes* [MLN]) qui drainent la sous-muqueuse intestinale. Une réponse immunitaire spécifique est alors induite, résultant en l'activation des cellules T et B présentes et la production d'IgA spécifiques, mais également la différenciation de cellules T régulatrices : les MLN seraient ainsi des sites clés pour l'induction de la tolérance orale [11].

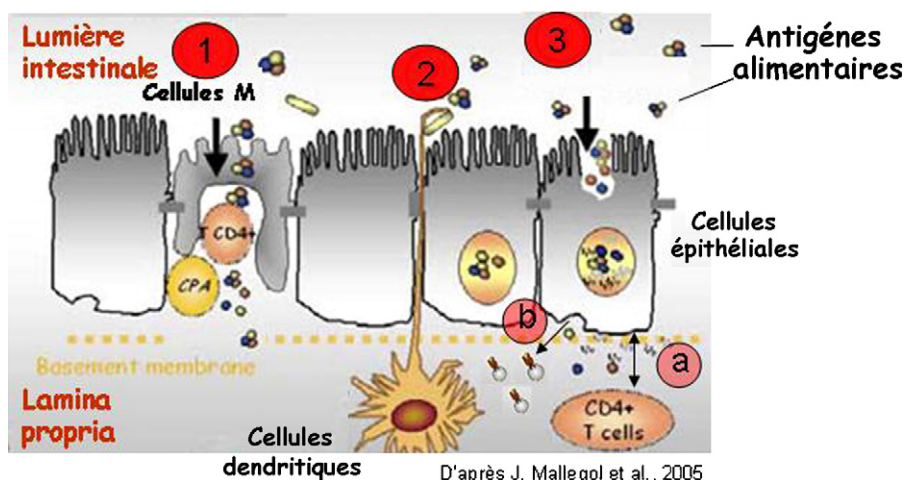


Fig. 1. La prise en charge des antigènes alimentaires présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale. Le passage transépithélial des antigènes présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire du GALT implique trois voies différentes : (1) la capture par les cellules M recouvrant les plaques de Peyer, (2) l'échantillonnage direct par les cellules dendritiques de la *lamina propria*, via des dendrites s'étendant dans la lumière intestinale, et (3) endocytose des antigènes par les cellules épithéliales puis présentation aux cellules T sous-jacentes (a) ou libération d'exosomes portant les peptides antigéniques associés au molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (b). Adapté d'après Mallegol et al., 2005 [10].

Enfin, en plus de leur rôle dans l'absorption des nutriments, les entérocytes sont capables de phagocyter des antigènes alimentaires, puis après dégradation intracellulaire par voie lysosomiale, de les présenter en association avec des molécules du CMH aux cellules T intraépithéliales (Fig. 1). L'intensité et l'efficacité de cette présentation dépendent du niveau d'activation des entérocytes et serait particulièrement élevées lors de réactions inflammatoires intestinales. Cependant, l'activation de cellules T naïves par ces cellules épithéliales reste incertaine, et de nombreuses études restent à mener pour caractériser le type de réponse induite lors d'une présentation antigénique par ces cellules (tolérance, inflammation, suppression) [12]. En parallèle de ce rôle de cellules présentatrices d'antigènes, les cellules épithéliales intestinales produisent des vésicules portant des peptides exogènes en association avec les molécules du CMH de classe II (Fig. 1). Ces vésicules, ou exosomes, interagissent préférentiellement avec les cellules dendritiques de la *lamina propria*, et potentialisent leur capacité de présentation antigénique aux cellules T. Bien que le type de réponse induite ne soit pas décrit, ces exosomes constitueraient un lien très important entre les antigènes de la lumière intestinale et les cellules immunitaires de la lamina propria [10,13]. De plus, une voie non lysosomiale a été mise en évidence dans les entérocytes, conduisant à un passage d'antigène non dégradés (environ 2 % des protéines) directement dans la circulation [14].

À la naissance, le système immunitaire associé au tractus gastro-intestinal n'est pas mature : les IgA peuvent alors provenir du lait maternel, ou résulter de l'activation des cellules B1 du péritoine, indépendamment des cellules T. Ces cellules produisent des IgA poly-réactives d'affinités faibles mais suffisantes pour permettre une exclusion efficace [15]. Le développement et la maturation correctes du système immunitaire intestinal et systémique requiert la présence d'un microbiote intestinal varié et riche [revue dans 16,17]. Celui-ci influencerait directement la biologie des cellules épithéliales et la fonction des cellules dendritiques et des cellules T et B. L'expression de *Toll Like Récepteurs* (TLR) par les cellules dendritiques et les cellules épithéliales serait notamment à la charnière d'un dialogue permanent entre les bactéries de la lumière intestinale et le système immunitaire, permettant l'induction d'une réponse appropriée sous l'action des cellules Treg, Th1 ou Th2 [18,19]. L'hypothèse hygiéniste tient donc sa place dans le développement de réponses immunitaires adaptées au niveau intestinal.

1.3. Un devenir particulier des allergènes alimentaires dans le tractus gastro-intestinal ?

Du fait de l'intense dégradation survenant lors du processus de digestion, et de l'efficacité théorique du système immunitaire intestinal pour l'induction d'une tolérance orale, la question se pose de savoir pourquoi/comment une protéine alimentaire peut devenir un allergène alimentaire. Un facteur intervenant en premier lieu est le niveau d'exposition de l'organisme, lié lui-même à l'abondance de l'allergène dans l'aliment qui déterminera in fine la dose d'allergène atteignant les sites d'induction de la réponse immunitaire. Mais des

propriétés intrinsèques des allergènes alimentaires ont été mises en évidence pour rendre compte, au moins en partie, de leur allergénicité.

1.3.1. Études *in vitro* de la digestibilité d'allergènes purifiés : les allergènes alimentaires sont-ils tous résistants à la digestion ?

La résistance aux conditions acides et à la digestion pourrait permettre la prise en charge au niveau du GALT des allergènes entiers, ou du moins de gros fragments immunogéniques issus de ces allergènes, et l'induction d'une réponse immunitaire locale. À l'inverse, la sensibilité des protéines alimentaires non allergènes à la protéolyse pourrait conduire à la génération de peptides tolérogènes ou encore à une ignorance immunitaire. Dans ce contexte, une première étude de digestibilité *in vitro* par des tests censés simuler les conditions de la digestion semblait démontrer qu'une caractéristique des allergènes alimentaires est leur grande résistance à la digestion gastrique, notamment à la pepsinolyse [20]. Cependant, des études ultérieures démontrent que le problème est plus complexe [21]. La comparaison de ces études n'est pas aisée du fait des conditions expérimentales variées et souvent drastiques appliquées. Des méthodes standardisées de mesure de la résistance à l'action de la pepsine ont depuis été proposées pour permettre une évaluation de l'allergénicité des *nouveaux aliments* [22]. Afin d'étudier le devenir des allergènes versus des protéines non-allergènes dans le tractus gastro-intestinal, de nombreux modèles de digestibilité *in vitro* ont maintenant été développés. Ils utilisent la pepsine (digestion gastrique) et la trypsine/chymotrypsine (digestion duodénale) mais en conditions plus physiologiques. Ces conditions tiennent compte des valeurs réelles du pH et de son évolution, du ratio enzyme : protéine et de la présence d'agents surfactants pouvant conduire à des modifications de structure des protéines alimentaires, les protégeant éventuellement des attaques enzymatiques [23]. 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.

Ces études de résistance à la protéolyse ont permis de distinguer les allergènes alimentaires dits « vrais » des allergènes dits « incomplets ». Ces derniers seraient capables de déclencher une réaction allergique chez des sujets déjà sensibilisés, mais pas de sensibiliser l'organisme *de novo*. Ils se distingueraient par le fait qu'ils sont rapidement dégradés pendant la digestion et ne pourraient donc pas induire la production d'IgE spécifiques. Le déclenchement de la réaction allergique suite à l'ingestion de ces allergènes conduit généralement à un syndrome oral (ou *Oral Allergy Syndrome* [OAS]) résultant d'une réaction croisée avec des allergènes de pollens ou de latex (allergènes sensibilisants). À titre d'exemple, les allergènes homologues de l'allergène du pollen de bouleau Bet v1, présents dans la pomme (Mal d 1), la noisette (Cor a 1) ou le céleri (Api g 1) sont responsables d'allergies alimentaires localisées, limitées à la cavité orale qui sont associées à une pollinose au bouleau [24,25]. Les tests de digestibilité gastroduodénale *in vitro* des allergènes Mal d 1, Cor a 1.04 et Api g 1 démontrent effectivement la dégradation rapide

de ces protéines. Les produits de digestion ont perdu leur capacité de se lier aux IgE et donc de provoquer une libération d'histamine au niveau intestinal. Cependant, il est à noter que certains de ces allergènes restent capables d'induire la prolifération des cellules T après leur digestion : l'ingestion de ces allergènes pourrait conduire à l'activation locale des cellules T, à la migration et au *homing* de ces cellules au niveau cutané, puis finalement à l'apparition de signes cliniques retardés T-dépendants [26]. Un travail récent sur la digestibilité in vitro d'un extrait de kiwi démontre clairement la disparition rapide de certains allergènes, correspondant aux allergènes reconnus par les IgE de patients souffrant d'OAS (réactivité croisée avec le latex ; [27]). De même, des études sur l'allergie à l'avocat ont montré que l'allergène Prs a 1, responsable du syndrome latex-fruit, est également rapidement dégradé in vitro, avec disparition rapide de la protéine au profit de peptides non détectables en électrophorèse SDS-PAGE [28]. Cependant, les tests d'inhibition de la liaison des IgE spécifiques anti-Prs a1 à l'allergène natif par les digestats ont montré que certains peptides issus de la digestion de Prs a 1 ont conservé la même capacité de liaison que Prs a 1 non digéré. De plus, ils provoquent des tests cutanés positifs in vivo chez certains patients. La présence d'épitopes B reliés entre eux par des ponts disulfures expliquerait l'activité biologique des digestats chez ces patients, mais la corrélation à des symptômes gastro-intestinaux sévères n'est pas décrite [28]. L'absence d'épitope T et/ou la dégradation des fragments au niveau intestinal pourraient expliquer l'absence de sensibilisation intestinale par ces allergènes.

À l'inverse, les allergènes alimentaires « vrais » sont à la fois capables de sensibiliser un sujet atopique et de provoquer le déclenchement d'une réaction allergique suite à un second contact. Même si d'autres voies semblent pouvoir intervenir, notamment la voie cutanée [29,30], la sensibilisation se produirait majoritairement par voie digestive. La stabilité de l'allergène alimentaire et sa capacité à être absorbé sous une forme immunoréactive seraient donc des facteurs déterminant dans son pouvoir sensibilisant.

Des allergènes animaux tels que la β -lactoglobuline (BLG) du lait de vache ou l'ovalbumine sont caractérisés par une certaine résistance à la digestion par la pepsine [31,23]. Cependant, les travaux déjà anciens de Haddad [32] confirmés par Selo et al. [33] ont montré que l'allergénicité de la BLG 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 BLG peut augmenter son allergénicité en révélant des épitopes masqués au sein la structure tertiaire de la protéine. De façon similaire, les IgE de patients souffrant de réactions systémiques suite à l'ingestion de kiwi possèdent des IgE spécifiques d'épitopes résistants, voire démasqués, lors de la digestion [27].

De nombreux allergènes végétaux sensibilisant via le tractus gastro-intestinal appartiennent à la famille des prolamines. Il s'agit de petites protéines dont la structure très compacte du fait de la présence d'une série de ponts disulfures leur confère une forte résistance aux traitements thermiques et à la digestion par la pepsine [23]. Cette famille comprend les protéines de transfert non-spécifiques de lipides (ns-LTP ; 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...) et les inhibiteurs d' α -amylase. Ainsi, Pru av 3 est résistante à la digestion par la pepsine et aux traitements thermiques, contrairement à Pru av 1 (homologue de Bet v 1) et Pru av 4 (profiline) extraits du même fruit [34] (Fig. 2). La LTP du raisin (Vit v 1), également résistante à la digestion par la pepsine, est partiellement dégradée suite à la digestion gastroduodénale. Cependant, le fragment généré lors de cette digestion, d'une masse moléculaire d'environ 6000 Da, présente la même capacité de liaison aux IgE et le même pouvoir de dégranulation des basophiles que l'allergène natif [36] (Fig. 2). Dans le cas des albumines 2S de l'arachide Ara h 2 et Ara h 6, il a été mis en évidence un noyau central résistant à la digestion par la trypsine et la chymotrypsine et aux traitements thermiques qui possède la même capacité à déclencher la réaction allergique que les protéines intactes [37]. Après deux heures de digestion gastrique, environ 25 % de l'albumine 2S de la noix du Brésil demeure intacte, tandis que 50 % de la protéine est partiellement dégradée sous forme d'un fragment de 6400 Da. Suite à la digestion gastroduodénale, très peu de protéine demeure intacte et le fragment de 6400 Da est dégradé en fragments plus petits reliés entre eux par des ponts disulfures, constituant une entité d'un poids moléculaire d'environ 5000 Da. De façon intéressante, cet assemblage de fragments contient les épitopes T et B identifiés sur cet allergène [35] (Fig. 2). Il apparaît donc que la résistance à la digestion gastroduodénale des protéines de la famille des prolamines peut n'être que partielle et conduire à la génération de fragments protéiques possédant une immunogénicité et une réactivité suffisante pour induire la sensibilisation et le déclenchement de la réaction allergique au niveau gastro-intestinal, ce qui contribue à en faire des allergènes alimentaires puissants.

Les protéines résistantes à la digestion ne sont cependant pas obligatoirement toutes des allergènes, suggérant que les allergènes possèdent d'autres propriétés intrinsèques responsables du pouvoir sensibilisant. À l'inverse, des allergènes alimentaires sensibles à la digestion sont également capables de sensibiliser l'organisme au niveau du TGI. C'est le cas par exemple des caséines du lait, rapidement et complètement hydrolysées, de la tropomyosine, de l'ovomucoïde. Le cas de Ara h 1 est particulièrement intéressant. La digestion gastrique in vitro conduit à une dégradation très rapide de cette protéine, puisqu'après huit minutes, seuls des fragments de masse moléculaire inférieure à 6000 Da sont visibles en électrophorèse. La poursuite de la digestion gastrique pendant deux heures, suivie par une digestion duodénale de 16 minutes, correspondant au temps de transit jusqu'aux premières plaques de Peyer, conduit à une dégradation totale de ces fragments peptidiques [38] (Fig. 3A). Cependant, il apparaît que les produits de la digestion gastroduodénale sont capables de se lier aux IgE anti-Ara h1, de stimuler la prolifération de 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 (Fig. 3B). Ainsi, bien que totalement dégradée lors de la digestion gastroduodénale et indétectable par les méthodes d'analyse classiques, Ara h 1

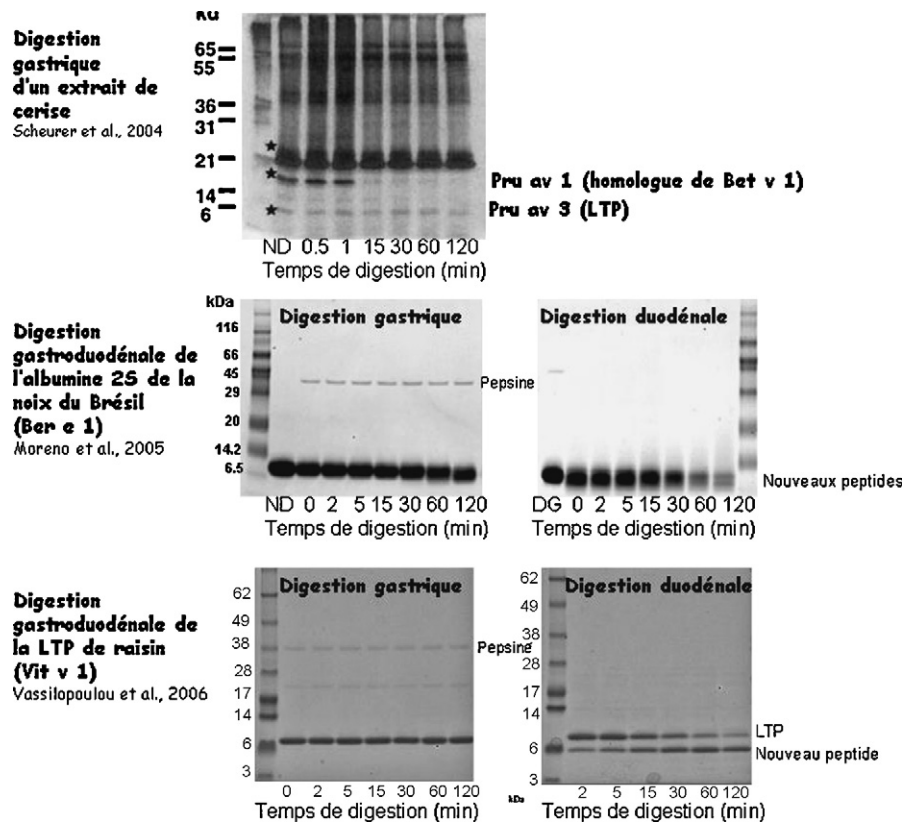


Fig. 2. Sensibilité/résistance à la digestion par la pepsine de quelques allergènes alimentaires. Un extrait de cerise [34], l'albumine 2S de la noix du Brésil (Ber e 1 ; [35]) ou la LTP de raisin (Vit v 1 ; [36]) sont soumis à une digestion gastrique in vitro par la pepsine (ratio 1 mg de protéine/182 U pepsine pour Ber e 1 et Vit v 1), puis duodénale par la trypsine et chymotrypsine (1 mg de protéine/34,5 U trypsine/0,44 U chymotrypsine) durant différents temps (0 à 120 minutes). Les digestats sont analysés en électrophorèse. Les ratios protéine/enzyme spécifiés correspondent à des conditions physiologiques. ND : non digéré, DG : digestat gastrique.

préserve son potentiel allergénique après digestion [38]. 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 d'environ 8000 et 11000 Da de masse moléculaire. 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 [39].

Ainsi, la digestion ne peut et ne doit pas être réduite à une perte d'allergénicité du fait de la dégradation des protéines en

fragments plus petits : le démasquage d'épitopes et/ou le réarrangement de ces fragments en nouvelles entités immunoréactives soulignent l'importance de réaliser des tests de digestibilité dans des conditions proches des conditions physiologiques, mais également des analyses biochimiques approfondies, notamment en conditions non dénaturantes. De plus, il apparaît maintenant nécessaire de réaliser également des analyses immunologiques, i.e., des tests de liaison aux IgE de patients allergiques (tests Elisa, électrophorèse puis immuno-empreinte avec les IgE de patients allergiques, tests

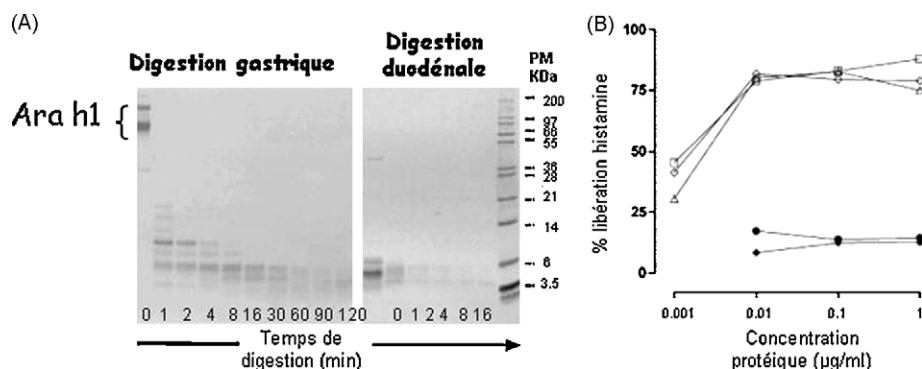


Fig. 3. Les produits de la digestion gastro-duodénale de Ara h 1 préservent un potentiel allergénique. A : suivi en électrophorèse, en conditions dénaturantes, de la dégradation de Ara h 1 lors de digestions gastriques et gastro-duodénale in vitro. B. Dégranulation de basophiles issus d'un patient allergique à l'arachide par Ara h 1 non digérée (□), Ara h 1 après 120 minutes de digestion gastrique (△), Ara h 1 après 120 minutes de digestion gastrique puis 16 minutes de digestion duodénale (◇), et par les contrôles correspondant aux fluides simulés de digestions gastrique (●) et duodénale (●). D'après Eiwegger et al., 2006 [39].

de dégranulation). Cette conclusion rejoint celle de Lucas et al. qui mettent en évidence, par immuno-empreinte, des allergènes du kiwi résistants à la digestion non visible en électrophorèse classique [27].

1.3.2. L'allergène n'est pas ingéré seul, mais intégré dans un aliment complexe

L'allergène est consommé sous forme d'aliment entier, plus ou moins modifié par des procédés industriels, et l'effet de la matrice alimentaire et des traitements technologiques ou simplement culinaires sur sa digestibilité peut être important. La susceptibilité à la protéolyse peut par exemple être modifiée suite à des traitements thermiques [40], des traitements à haute pression [41], ou des interactions entre les allergènes et des lipides ou des polysaccharides [36]. Grimshaw et al. ont montré que des patients allergiques à l'arachide soumis à un test de provocation oral réagissent à des dose-seuils d'arachide plus élevées si le taux en lipides du support est augmenté [42]. L'hypothèse avancée est que la libération des allergènes de l'arachide, et donc leur absorption, est plus lente et progressive en présence de forts taux de lipides. L'effet tampon de certaines matrices et/ou aliments pris conjointement à l'allergène – ou la prise médicamenteuse d'antiulcéreux visant à neutraliser l'acidité gastrique, pourront par ailleurs conduire à la digestion incomplète d'allergènes normalement sensibles à la digestion. Ainsi, les allergènes de morue sont dégradés très rapidement par une digestion gastrique à pH 2, tandis les allergènes majeurs sont toujours présents après deux heures de digestion gastrique à pH 3 [43]. De même, les allergènes du kiwi sensibles à la digestion gastrique à pH 1,5 ne sont plus dégradés si le pH est supérieur à 2,5 [27].

De nouveaux modèles de digestion in vitro d'aliments entiers mimant les processus chimiques et physiques de la digestion sont en cours de développement et devraient permettre d'obtenir de nouvelles informations quant à la digestibilité des allergènes au sein de l'aliment. En parallèle, des études de digestibilité in vivo de l'arachide et du lait de vache ont été menées chez des sujets non allergiques lors du programme européen Allergest [44]. Suite à l'ingestion de l'aliment, des prélèvements gastriques échelonnés (de zéro à 120 minutes) ont été réalisés. L'analyse de ces prélèvements en électrophorèse a montré que les profils de digestion sont très variables d'un sujet à l'autre, les protéines du lait et de l'arachide étant dégradées plus ou moins vite selon les sujets. Cela confirme l'existence de « digesteurs lents » et de « digesteurs rapides », et suggère qu'une modélisation in vitro universelle reste peu envisageable. Quoiqu'il en soit, la digestion gastrique de l'arachide conduit à une dégradation rapide de Ara h 1 et plus lente de Ara h 2 et Ara h 6, avec la formation de fragments peptidiques, comme observé in vitro. Les tests de liaisons aux IgE de patients allergiques confirment également les résultats in vitro, montrant que les digestats gastriques ont conservé l'immunoréactivité de l'arachide. Dans le cas du lait au contraire, la digestion conduit à une perte de l'immunoréactivité de la BLG et des caséines [44,45]. L'effet de la digestion sur l'allergénicité du lait a cependant été testé chez l'adulte, pour lequel les conditions de digestion ne sont

pas les mêmes que chez l'enfant de moins de trois ans, majoritairement concerné par l'allergie au lait de vache.

La comparaison des résultats in vitro et in vivo devrait permettre la mise au point de modèles de digestibilité d'aliments entiers plus physiologiques et finalement de mieux cerner les entités et les interactions responsables de la sensibilisation gastro-intestinale.

1.3.3. L'allergène déterminerait sa voie d'entrée au niveau de la muqueuse intestinale

Malgré l'intégrité de la barrière intestinale, l'absorption gastro-intestinale d'allergènes entiers a été démontrée in vitro [46,47] et in vivo [48]. Le point de passage de la protéine semble être un facteur très important pour la sensibilisation. En effet, le lieu d'entrée de la protéine et le type de réponse immunitaire induite seraient liés. Au niveau des cellules M, les particules et macromolécules sont efficacement endocytées puis transmises sans dégradation au système lymphatique sous-jacent (Fig. 1) : une entrée via les cellules M et une présentation au niveau des PP favoriserait une réponse locale et systémique. À l'inverse, les antigènes solubles peuvent, soit être captés par les entérocytes, ils subissent alors majoritairement une dégradation intracellulaire lysosomiale, soit être pris en charge par les cellules dendritiques de la *lamina propria*, et transportés au niveau des ganglions mésentériques (Fig. 1 ; [11]). Ces voies favoriseraient l'induction de réponses régulatrices.

De façon intéressante, il apparaît que la voie d'entrée dans l'organisme serait en partie dictée par la nature de l'antigène/l'allergène. In vitro, la β lactoglobuline native est transportée de façon plus efficace par les cellules M que par les entérocytes, tandis que le traitement thermique diminue ce passage [49]. Par ailleurs, la digestion gastrique puis duodénale d'arachide grillée conduit à la rupture des membranes cellulaires de la graine d'arachide, puis à la libération de corps protéiques et de protéines solubles. Chez la souris, l'application de ces digestats dans la lumière intestinale au niveau de l'iléon a permis de démontrer que les corps protéiques et les protéines solubles sont rapidement et exclusivement pris en charge par les cellules M. Trente minutes après l'application luminale des digestats, les protéines sont présentes dans le tissu lymphoïde sous-jacent au follicule et internalisées par des cellules lymphoïdes, probablement des cellules présentatrices d'antigène [48]. Des études complémentaires, comparant des aliments allergéniques et non allergéniques permettraient de confirmer une voie d'entrée particulière pour les allergènes.

1.3.4. Existe-t-il une absorption pré-gastrique ?

Enfin, il apparaît qu'une absorption pré-gastrique d'allergène entier ait lieu, au niveau de la muqueuse buccale qui serait également un lieu d'entrée d'allergènes dans l'organisme [50,43]. L'étude de Dirks et al. repose sur la consommation de 3,5 à 100 g d'arachide par des individus non allergiques, puis à des prélèvements sanguins dix minutes à 24 heures après ingestion [50]. Ces sérums sont capables d'induire la dégranulation de basophiles sensibilisés passivement avec des IgE de patients allergiques à l'arachide. Des allergènes

entiers ou partiellement dégradés sont donc présents dans la circulation sanguine après l'ingestion de graines d'arachide, ces molécules étant fonctionnelles. La dégranulation est effective avec des sérums prélevés dès dix minutes après l'ingestion, suggérant donc une absorption rapide, pré-gastrique, des allergènes. Cette hypothèse a été confirmée lors d'une expérience durant laquelle dix sujets non allergiques ont mâché 10 g d'arachide pendant deux minutes, puis recraché l'aliment avant de se rincer la bouche. Bien qu'aucun des sujets n'ait avalé d'arachide, les sera prélevés dix minutes plus tard sont capables d'induire la dégranulation des basophiles sensibilisés passivement, démontrant une absorption buccale d'allergènes entiers ou de fragments immunoréactifs fonctionnels et leur passage dans la circulation générale [50]. Ce phénomène pourrait expliquer la survenue rapide de symptômes systémiques après ingestion de cacahuètes chez certains patients sensibilisés. La survenue d'une telle absorption est variable d'un individu à l'autre et la sensibilisation du système immunitaire par cette voie n'est pas décrite. Des travaux complémentaires devraient être menés, incluant d'autres aliments, afin de caractériser les allergènes (ou leurs fragments) absorbés précocement et éventuellement de mettre en évidence les caractéristiques permettant ce passage.

2. Conclusion

Bien que les voies de sensibilisation non intestinales (muqueuse buccale, peau...) devraient être explorées plus en détail, la voie digestive est largement impliquée dans les allergies alimentaires. Les facteurs intervenant dans la sensibilisation et le déclenchement de la réaction allergique au niveau du tractus gastro-intestinal sont multiples et complexes. Ils font intervenir des propriétés intrinsèques de la protéine telles que la résistance au moins partielle à la digestion, l'existence de voies d'entrée particulières dans l'organisme ou des propriétés adjuvantes de la matrice alimentaire. Le devenir de l'allergène dans le tractus gastro-intestinal et la réponse immunitaire spécifique induite dépendent également de l'aliment contenant l'allergène et des traitements technologiques qu'il a subis, des conditions environnementales, notamment d'hygiène, qui interagissent avec la microflore intestinale et les cellules de la muqueuse intestinale (entérocytes, cellules dendritiques) et de l'état physiologique/pathologique de l'hôte. Bien qu'apportant des connaissances théoriques très importantes, l'analyse des biotransformations subies par un allergène alimentaire dans le tube digestif ne peut être résumée aux seules études in vitro de la digestibilité de protéines isolées. De nouvelles données, obtenues grâce à des modèles de digestion d'aliments entiers in vitro ou in vivo dans des conditions bien contrôlées, conjointement à des caractérisations biochimiques et des études immunologiques plus poussées des digestats et des interactions physicochimiques entre les entités produites devraient permettre de mieux comprendre ce qui fait d'une protéine un allergène dans un contexte donné.

Références

- [1] Walker WA, Isselbacher KJ. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. Possible role in clinical disorders. *Gastroenterology* 1974;67(3):531–50.
- [2] Warsaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* 1974;66(5):987–92.
- [3] Bloch KJ, Walker WA. Effect of locally induced intestinal anaphylaxis on the uptake of a bystander antigen. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67:312–6.
- [4] Turner MW, Boulton P, Shields JG, Strobel S, Gibson S, Miller HRP, et al. Intestinal hypersensitivity in the rat. I. Uptake of intact protein, permeability to sugars and their correlation with mucosal mast-cell activation. *Immunology* 1988;63:119–24.
- [5] Gee JM, Wal JM, Atkinson H, Grigoriadou F, Wortley GM, Wijnands MVW, et al. Effect of saponin on the transmucosal passage of β lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β lactoglobulin-sensitized rats. *Toxicology* 1997;117:219–28.
- [6] Untermayr E, Scholl I, Swoboda I, Beil WJ, Forster-Waldl E, Walter F, et al. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in Balb/c mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:616–23.
- [7] Neutra M. Current concepts in mucosal immunity. V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am J Physiol* 1998;37:G785–91.
- [8] Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;191:1381–94.
- [9] Zhao X, Sato A, la Cruz CS, Linehan M, Luegering A, Kucharzik T, et al. CCL9 is secreted by the follicle associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J Immunol* 2003;171: 2797–803.
- [10] Mallegol J, van Niel G, Heyman M. Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:11–6.
- [11] Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203:519–27.
- [12] Hershberg RM, Mayer LF. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol Today* 2000;21:123–8.
- [13] Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candali C, Brugière S, Tomaskovic-Crook E, et al. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 2003;52:1690–7.
- [14] Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:3–12.
- [15] Harris NL, Spoerri I, Schoepfer JF, Nembrini C, Merky P, Massacand J, et al. Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J Immunol* 2006;177:6256–62.
- [16] Kelly D, King T, Aminov R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res* 2007;622: 58–69.
- [17] Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T-cell independent mechanism of intestinal mucosal IgA response to commensal bacteria. *Science* 2000;288:2222–6.
- [18] Forchielli M-L, Walker WA. The role of gut associated lymphoid tissues and mucosal defense. *British J Nutr* 2005;93:S41–8.
- [19] Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor- β . *Immunology* 2008;123:197–208.
- [20] Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996;14:1269–73.
- [21] Fu TJ, Abbott UR, Hatzos C. Digestibility of food allergens and non-allergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – a comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50:7154–60.

- [22] Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, et al. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39:87–98.
- [23] Moreno FJ. Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed Pharmacother* 2007;61:50–60.
- [24] Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:962–9.
- [25] Wensing M, Akkerdaas J, van Leeuwen W, Stapel S, Bruijnzeel-Koomen C, Aalberse R, et al. IgE to Bet v 1 and profilin: Cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:435–42.
- [26] Schimek EM, Zwölfer B, Briza P, Jahn-Schmid B, Vogel L, Vieths S, et al. Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1327–33.
- [27] Lucas JS, Cochrane SA, Warner JO, Hourihane JO. The effect of digestion and pH on the allergenicity of kiwifruit proteins. *Pediatr Allergy Immunol* 2008 (sous presse).
- [28] Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo G. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1002–7.
- [29] Lack G, Fox D, Northstone K, Golding J. Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N Engl J Med* 2003;348:977–85.
- [30] Adel-Patient K, Ah-Leung S, Bernard H, Durieux-Alexandrenne C, Créminon 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 Arch Allergy Immunol* 2007;143:10–20.
- [31] Wal JM. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:2–11.
- [32] Haddad ZH, Kalra V, Verma S. IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of beta-lactoglobulin: significance in food hypersensitivity. *Ann Allergy* 1979;42:368–71.
- [33] Selo I, Clement G, Bernard H, Chatel JM, Creminon C, Peltre G, et al. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1055–63.
- [34] Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, Moncin MSM, Retzek M, Hartz C, et al. 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;114:900–7.
- [35] Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MSJ, Bottrill AR, Mills ANC. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal* 2005;272:341–52.
- [36] Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, et al. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:473–80.
- [37] Lehman K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Suhr M, Becker WM, et al. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochem J* 2007;395:463–72.
- [38] Eiwegger T, Rigby N, Mondoulet L, Bernard H, Krauth M-T, Boehm A, et al. Gastro-duodenal digestion products of the major allergen Ara h1 retain an allergenic potential. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1281–8.
- [39] Rigby N, Watson A, Mondoulet L, Eiwegger T, Szépfalusi Z, Nielsen K, Madsen C, Adel-Patient K, Bernard H, Wal J-M, Mills C. Aggregated pepsinolysis products of the major peanut allergen Ara h1 are IgE reactive. *Soumis à J Agric Food Chem*.
- [40] Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull* 2003;26:969–73.
- [41] Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2008;9:62–9.
- [42] 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. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1581–5.
- [43] Untersmayr E, Vestergaard H, Malling HJ, Jensen LB, Platzer MH, Boltz-Nitulescu G, et al. Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:711–7.
- [44] Allergest: “The Effect of Gastrointestinal Digestion on the Allergenicity of Foods” – QLK1-CT-2001-01239.
- [45] 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. Thèse INSA de Toulouse – École doctorale SEVAB, soutenue le 12 juillet 2005.
- [46] Moreno FJ, Rubio LA, Olano A, Clemente A. Uptake of 2S Albumin allergens, Ver e1 and Ses e1, across human Intestinal Epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 2006;54:8631–9.
- [47] Bodinier M, Legoux MA, Pineau F, Triballeau S, Segain JP, Brossard C, et al. Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line. *J Agric Food Chem* 2007;55:4576–83.
- [48] Chambers SJ, Wickham MS, Regoli M, Bertelli E, Gunning PA, Nicoletti C. Rapid in vivo transport of proteins from digested allergen across pre-sensitized gut. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1258–63.
- [49] Rytönen J, Valkonen KH, Virtanen V, Foxwell RA, Kyd JM, Cripps AW, et al. Enterocyte and M-cell transport of native and heat-denatured bovine beta-lactoglobulin: significance of heat denaturation. *J Agric Food Chem* 2006;54:1500–7.
- [50] Dirks CG, Pedersen MH, Platzer MH, Bindslev-Jensen C, Skov PS, Poulsen LK. Does absorption across the buccal mucosa explain early onset of food-induced allergic systemic reactions? *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1321–3.