

Article original

Influence des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide

Influence of thermal processing on the IgE binding capacity of peanut allergens

L. Mondoulet ^{a,*}, M.-F. Drumare ^a, S. Ah-Leung ^a, E. Paty ^b,
P. Scheinmann ^b, J.-M. Wal ^a, H. Bernard ^a

^a INRA-Laboratoire d'immuno-allergie alimentaire, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France

^b Service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques, groupe hospitalier Necker, 75743 Paris cedex 15, France

Reçu le 8 septembre 2003 ; accepté le 18 septembre 2003

Résumé

Objectifs. – L'arachide est un des allergènes les plus souvent impliqués dans les allergies alimentaires [1]. Cependant, l'allergie à l'arachide présente une répartition inégale dans le monde et semble résulter à la fois du niveau et du mode de consommation des arachides dans les populations concernées. En effet, les procédés technologiques influent sur l'allergénicité des protéines de l'arachide. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de certains procédés thermiques sur la reconnaissance des allergènes de l'arachide par les immunoglobulines E (IgE) de patients allergiques.

Matériel et méthodes. – Différents extraits protéiques sont préparés à partir de graines crues, bouillies ou grillées. Les protéines sont isolées, purifiées et caractérisées par électrophorèse. L'immunoréactivité des différents extraits protéiques est analysée par Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST) et EAST inhibition à l'aide de 37 sérums de patients allergiques à l'arachide. Des immuno-empreintes sont également réalisées.

Résultats. – L'analyse biochimique des extraits fait apparaître de légères modifications dans la composition protéique après cuisson de la graine, notamment par ébullition. L'intensité de la réponse IgE contre l'extrait protéique issu de graines bouillies est diminuée de moitié par rapport à celle obtenue contre les extraits issus de graines crues ou grillées. Cette différence de reconnaissance par les IgE de patients allergiques à l'arachide est confirmée par des tests d'EAST inhibition. Elle met notamment en jeu les protéines de faibles masses molaires. On n'observe aucune différence significative d'immunoréactivité entre les extraits cru et grillé.

Conclusion. – Le grillage ne modifie pas l'allergénicité de l'arachide mais la cuisson dans l'eau bouillante la diminue considérablement. Cette diminution d'allergénicité des arachides bouillies provient de la perte d'une partie des allergènes dans l'eau de cuisson. Elle peut être également due à des modifications structurales subies par les protéines de l'arachide lors des procédés thermiques en milieu aqueux.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Peanuts are one of the allergens most often responsible for food allergy [1]. Nevertheless, the occurrence of peanut allergy varies between countries and appears to result from both the amount of peanuts in the diet and the way they are consumed. In addition, processing influences the allergenicity of peanut proteins. The aim of the present study was to examine the effect of some thermal processes on the IgE binding capacity of peanut allergens, using sera of patients allergic to peanuts. Protein extracts were prepared from raw, roasted and boiled peanuts. In each case, the proteins were isolated, purified and characterised by electrophoresis. The immunoreactivity of each protein extract was analysed using the Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST) and EAST inhibition with sera from 37 peanut allergic patients. Western blots were also performed. The biochemical analysis of the whole protein extracts revealed slight modifications in the protein composition, particularly after boiling. The IgE binding capacity of the boiled peanut protein extract was reduced by 50% compared to raw and roasted peanut extracts. This difference on the recognition of peanut allergens by patients' IgE was confirmed by the inhibition assays. Impaired IgE recognition mainly involves proteins of low molecular weight. No difference in immunoreactivity was observed between raw and roasted peanut protein extracts.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : mondoulet@dsvidf.cea.fr (L. Mondoulet).

Roasting peanuts does not modify their allergenicity while boiling decreases it considerably. This decrease of boiled peanut allergenicity comes from a loss of some allergens into the boiling water. It may also be due to structural modifications of peanut proteins that occur in boiling water.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie alimentaire ; Arachide ; Allergènes ; Ara h 1 ; Ara h 2 ; Procédés thermiques

Keywords: Food allergy; Peanuts; Allergens; Ara h 1; Ara h 2; Thermal processing

1. Introduction

L'allergie à l'arachide est un véritable problème de santé publique dans certains pays en raison de sa fréquence, de la sévérité des manifestations cliniques et de sa persistance. La prévalence de l'allergie à l'arachide varie entre 0,5 et 1,1 % [1–3] mais elle dépend de la population étudiée. Ainsi, la fréquence de l'allergie à l'arachide est bien plus forte dans les pays occidentaux, notamment aux États-Unis, que dans ceux d'Extrême-Orient, particulièrement en Chine. Cette différence ne peut s'expliquer seulement par l'importance de l'arachide dans l'alimentation ou par la nature des variétés consommées. Les habitudes alimentaires et les modes de consommation peuvent aussi intervenir. En effet, il a été montré que le fait de griller les arachides pouvait augmenter leurs propriétés allergéniques, notamment leur capacité de liaison aux IgE spécifiques par comparaison aux arachides crues [4]. À l'inverse, l'allergénicité des arachides bouillies ou frites, telles qu'elles sont consommées traditionnellement en Chine, serait diminuée [5].

Le but de cette étude est d'analyser l'influence de procédés thermiques appliqués à l'arachide sur la reconnaissance des allergènes par les IgE spécifiques chez une population importante de patients allergiques.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sérums

Trente-sept sérums ont été utilisés pour cette étude. Trente-cinq proviennent de patients allergiques à l'arachide suivis au service de pneumologie et d'allergologie pédiatriques de l'hôpital Necker-Enfants-Malades (Paris). Deux autres proviennent du département de pédiatrie de l'université de Vienne (Autriche). Les patients sont des enfants (22 garçons et 15 filles) de 2,5 à 17 ans (valeur de la médiane : six ans). Dans tous les cas, l'allergie à l'arachide est confirmée par des tests cliniques (tests cutanés, tests de provocation orale). Les manifestations cliniques présentées sont variées, de légères à sévères, avec des symptômes cutanés, gastro-intestinaux, respiratoires, voire généralisés.

Tous les essais ont été effectués sur des sérums individuels et non sur des pools de sérums.

2.2. Préparation des extraits protéiques d'arachide

Des arachides crues et des arachides grillées commerciales (*Arachis hypogae*, type Virginia) ont été utilisées pour

cette étude. Les arachides crues ont été bouillies à 100 °C pendant 30 minutes. L'eau de cuisson a été conservée pour des analyses ultérieures.

Les graines d'arachides (grillées, crues, bouillies) sont débarrassées de leur peau et grossièrement pilées puis broyées jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène qui est ensuite délipidée à l'éther. Les tourteaux délipidés sont séchés et remis en solution dans du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4 NaCl 1 M (10 %, p/v) pour procéder à l'extraction protéique pendant 4 heures à température ambiante sous agitation. Après centrifugation, les surnageants sont collectés, dialysés et congelés.

2.3. Analyse électrophorétique

La composition protéique des différents extraits est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices (SDS PAGE) suivant la méthode de Laemmli modifiée par Dean et al. [6]. Les protéines ainsi séparées sont colorées au bleu de Coomassie.

2.4. Immuno-empreintes réalisées avec des sérums de patients allergiques à l'arachide

Les immuno-empreintes sont réalisées après transfert sur membrane Immobilon P (Millipore, Polylabo) des protéines séparées sur gel de polyacrylamide. Les membranes sont saturées et incubées une nuit à +4 °C sous légère agitation avec les sérums dilués au 1/200. Après trois lavages, les membranes sont alors incubées 2 heures à température ambiante avec un anticorps polyclonal de lapin anti-IgE humaine marqué à la peroxydase (Star 96P, Serotec). Les immuno-empreintes sont alors de nouveau lavées, puis incubées avec le réactif chimioluminescent (*Supersignal West Dura Extended Duration Substrate*, PIERCE) et révélées sur film photographique Kodak (X-OMAT™).

2.5. Enzyme Allergo Sorbent Test (EAST) et EAST inhibition

L'immunoréactivité des différents extraits est analysée à l'aide d'un test EAST utilisé soit par la méthode directe soit par inhibition. Le dosage immuno-enzymatique utilisé a été développé au laboratoire et sa mise en œuvre pour la détection et la quantification des IgE spécifiques des allergènes du

lait et de l'arachide a été décrite précédemment [7,8]. Brièvement, il utilise des plaques de microtitration sur lesquelles l'allergène, ici l'extrait protéique brut, est adsorbé. Des dilutions de chaque sérum sont alors mises en contact pendant 24 heures à +4 °C. Un anticorps monoclonal anti-IgE humaine (clone BS 17) marqué à l'acétylcholinestérase (AChE) est utilisé comme traceur. La révélation est réalisée par réaction colorimétrique de l'AChE avec le réactif d'Ellmann. La quantification des IgE spécifiques est effectuée par comparaison à une gamme d'étalonnage d'IgE totales établie dans des conditions identiques en utilisant une phase solide constituée d'un anticorps anti-IgE humaine (LE 27) complémentaire de l'anticorps traceur BS 17 marqué à l'AChE.

Les études par compétition reprennent les conditions du test direct avec une étape préalable supplémentaire correspondant à une préincubation de 50 µl de sérum humain dilué avec 50 µl de compétiteur. Les compétiteurs sont des solutions contenant des concentrations croissantes d'extraits protéiques d'arachides grillées, crues ou bouillies. Les résultats sont exprimés en terme de % de liaison : B/B_0 où B_0 et B représentent respectivement les IgE spécifiques liées sur la phase solide en absence ou en présence d'une concentration donnée de compétiteur.

2.6. Analyses statistiques

Les réponses IgE spécifiques anti-arachides n'obéissent pas à une loi normale. Elles sont donc traitées statistiquement par des tests non paramétriques tels que le test de Friedman. Les liens entre ces réponses sont estimés à l'aide des corrélations des rangs de Spearman.

3. Résultats

3.1. Analyse de la capacité de liaison aux IgE des différents extraits protéiques

La caractérisation de la réponse IgE spécifique et sa quantification ont été effectuées à l'aide du test EAST sur les 37 sérums de patients allergiques. Les concentrations d'IgE spécifiques sont rapportées pour chaque sérum et pour chaque type d'extrait sur la Figure 1.

Les extraits protéiques issus d'arachides crues, grillées et bouillies ainsi que la fraction protéique retrouvée dans l'eau de cuisson sont tous reconnus par chacun des 37 sérums

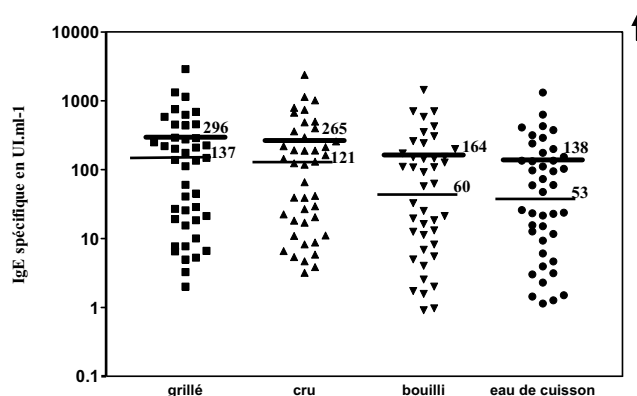


Fig. 1. Analyse de la réponse IgE contre les différents extraits protéiques d'arachide. Les différents points représentent la concentration en IgE spécifiques exprimée en UI ml⁻¹ pour chacun des 37 sérums testés.

— : valeur moyenne pour les 37 sérums ;
—— : valeur médiane pour les 37 sérums.

analysés. Les valeurs rapportées sur la Figure 1 montrent une très grande dispersion et une importante variabilité interindividus dans les concentrations en IgE anti-arachide quelque soit le traitement thermique appliqué. Elles peuvent varier de près d'un facteur 1000 dans une population de patients allergiques de même origine. Pour l'ensemble de la population de patients allergiques cependant, la répartition des réponses IgE aux différents extraits est semblable. Le calcul des valeurs moyennes et médianes ne fait apparaître aucune différence statistiquement significative entre les réponses IgE aux deux extraits grillé et cru.

En revanche, lorsque les graines d'arachides sont bouillies, l'extrait protéique manifeste une baisse d'immuno-réactivité (c'est-à-dire de capacité à être reconnu et fixé par les IgE de patients allergiques) de près de 50 % par rapport aux extraits de graines grillées ou crues. Cette différence est confirmée statistiquement par le test de Friedman ($P < 0,001$) (Tableau 1). Une part importante des IgE des patients fixe également les protéines extraites de l'eau de cuisson. La distribution en est très voisine de celle des IgE anti-protéines d'arachide bouillie (Fig. 1) bien que les valeurs moyennes et médianes soient légèrement inférieures, 138 vs 164 et 53 vs 60 UI·ml⁻¹ respectivement ; cette différence est statistiquement significative ($P < 0,05$) (Tableau 1). Il est à noter que la somme des réponses IgE médianes contre l'extrait bouilli et contre les protéines présentes dans l'eau de cuisson ($\Sigma = 113$ UI·ml⁻¹) est proche des réponses IgE médianes contre les extraits cru (121 UI·ml⁻¹) et grillé (137 UI·ml⁻¹).

Tableau 1

Résultats des tests statistiques (test de Friedman et corrélation des rangs de Spearman) de comparaison des différents extraits bruts d'arachide deux à deux

		grillé/cru	grillé/bouilli	cru/bouilli	grillé/eau	cru/eau	bouilli/eau
test de Friedman	<i>P</i>	ns	***	***	***	***	*
corrélation de Spearman	<i>r</i>	0,99	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99
	<i>P</i>	***	***	***	***	***	***

r est le coefficient de corrélation et *P* est la probabilité d'avoir un effet significatif (* : $P < 5\%$, test significatif ; ** : $P < 1\%$, test très significatif ; *** : $P < 10^{-3}$, test hautement significatif ; ns : non significatif)

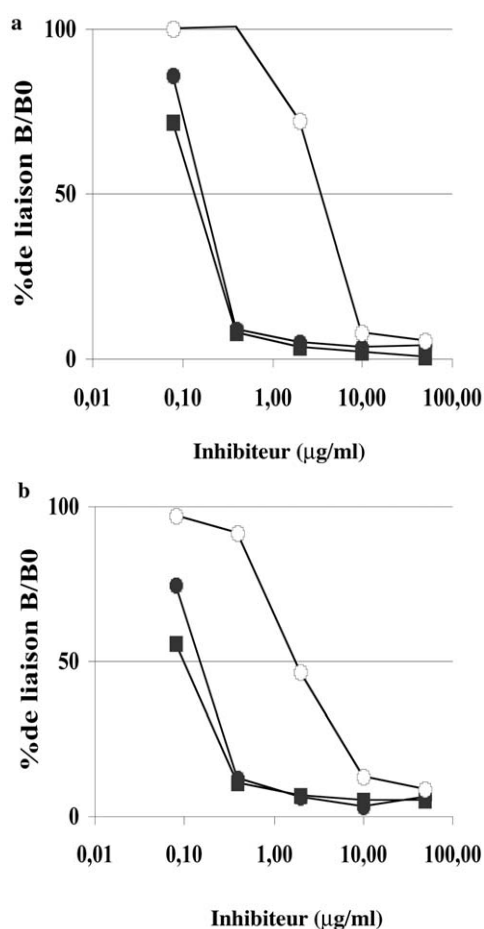


Fig. 2. Inhibition de la liaison des IgE anti-arachide par des concentrations croissantes d'extraits protéiques d'arachide grillées (■), crues (●), bouillies (○) pour deux sérums (a et b) de patients allergiques différents représentatifs de la population étudiée.

Le calcul des corrélations des rangs de Spearman montrent une forte corrélation quelque soit le couple étudié. Elle est toujours supérieure à 0,97 et hautement significative (Tableau 1).

Les courbes d'inhibition présentées en Figure 2 pour deux sérums représentatifs de la population étudiée ont été obtenues sur plaques de microtitration coâtées avec les protéines extraites d'arachides grillées.

Les courbes obtenues avec les extraits grillé et cru sont très proches. En revanche, l'inhibition de la liaison aux IgE anti-arachide par l'extrait bouilli est plus difficile comme le montre le décalage de la courbe correspondante vers les fortes concentrations. L'inhibition de 50 % de la liaison nécessite une concentration 50 fois plus forte d'extrait d'arachide bouillie que d'extrait d'arachide crue ou grillée. D'autres essais ont été réalisés où l'extrait d'arachide crue a été immobilisé et les inhibitions de la liaison mesurées en présence de concentrations croissantes des différents compétiteurs. Ils montrent des résultats comparables, à savoir que les inhibitions par les extraits d'arachide crue et grillée sont proches et plus fortes que celles engendrées par les protéines d'arachide bouillie.

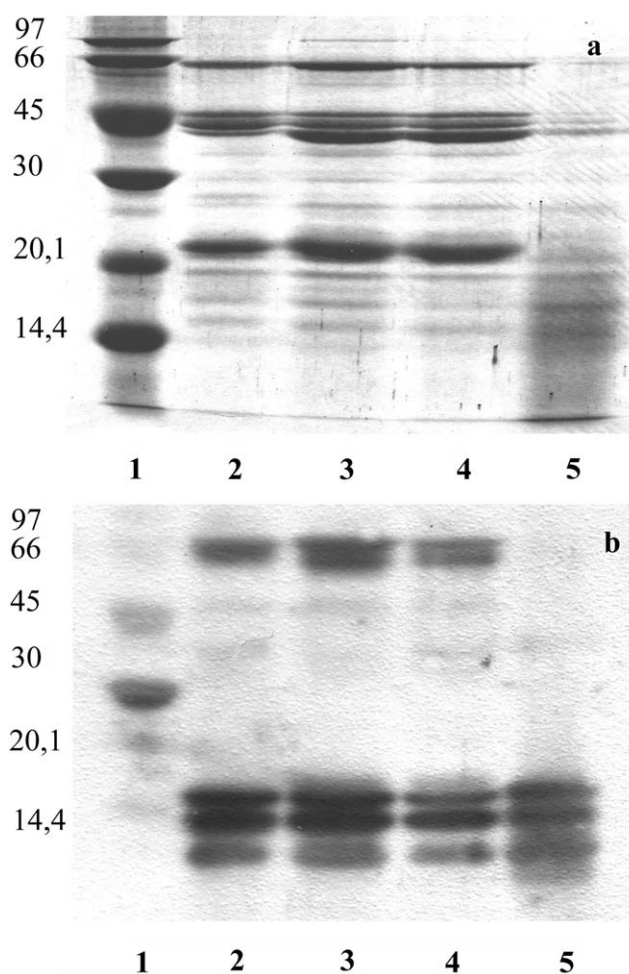


Fig. 3. (a) profil électrophorétique d'extraits protéiques d'arachides grillées (2), crues (3), bouillies (4) et d'eau de cuisson (5).

(b) immunoempreinte réalisée sur les mêmes échantillons.

Les marqueurs de poids moléculaires sont déposés dans le puits (1) pour l'électrophorèse et l'immuno-empreinte.

3.2. Comparaison des profils électrophorétiques des fractions protéiques extraites d'arachides grillées, crues, bouillies et de l'eau de cuisson

De nombreuses fractions protéiques sont séparées. Leurs masses molaires relatives (Mr), c'est-à-dire estimée en SDS PAGE par comparaison avec les marqueurs standard de masse molaire, varient de 14 à 90 kDa (Fig. 3a). La comparaison des profils électrophorétiques des extraits grillé et cru ne fait pas apparaître de différences majeures. Des bandes correspondant à des Mr d'environ 25 et 45 kDa sont particulièrement intenses. Des bandes moins marquées qui correspondent à des protéines de 66 et 14 à 20 kDa sont également bien visibles dans les deux extraits. En revanche, le profil électrophorétique de l'extrait d'arachide bouillie se distingue de celui des arachides crues et grillées par une atténuation des bandes protéiques de faible masse molaire (comprise entre 14 et 20 kDa). Parallèlement, l'analyse de l'eau de cuisson permet de mettre en évidence des bandes protéiques

essentiellement dans cette même gamme de Mr de 14 à 20 kDa.

3.3. Comparaison des immuno-empreintes obtenues avec les arachides grillées, crues, bouillies et avec l'eau de cuisson

Les immuno-empreintes sur la Fig. 3b font apparaître de nombreuses bandes de Mr inférieures à 20 kDa (notamment représentées par Ara h 2) et supérieures à 60 kDa (essentiellement Ara h 1) fortement reconnues par les IgE. Ces bandes très allergéniques sont de relativement faible concentration protéique car elles apparaissent de façon beaucoup moins intense après révélation au bleu de coomassie sur l'électrophorèse (Fig. 3a). Comme sur les électrophorèses, la principale différence concerne les profils de reconnaissance des allergènes de faible Mr dans les différents extraits et particulièrement dans l'extrait d'arachides bouillies où une intensité de liaison plus faible des IgE aux allergènes de Mr comprise entre 14 et 20 kDa est observée ; toutefois une partie de ces allergènes se retrouve dans l'eau de cuisson.

4. Discussion

L'influence des traitements thermiques sur l'allergénicité de l'arachide est particulièrement importante car ils interviennent lors des procédés industriels comme lors des méthodes de cuisson traditionnelles. Toutefois, les études publiées montrent des résultats parfois divergents. Un traitement à très haute température augmente l'allergénicité de l'arachide selon Maleki et al. [4] qui observent une capacité de liaison aux IgE 90 fois plus importante pour l'arachide grillée que pour la forme crue. À l'inverse, Burks et al. [9] n'obtiennent aucune modification de la capacité de liaison aux IgE et aux IgG spécifiques lorsque l'arachide est soumise à différents traitements thermiques. En accord avec cette dernière étude, nos résultats ne permettent pas de montrer de différence significative d'allergénicité entre les arachides grillées et crues. Par opposition à ce que l'on observe lors de traitements thermiques par voie sèche, la cuisson de l'arachide par ébullition entraîne une forte diminution d'allergénicité.

L'effet des traitements thermiques sur l'allergénicité des aliments ou, plus exactement, sur l'allergénicité des protéines des aliments est en général attribué aux modifications structurales que subissent ces protéines sous l'effet de la chaleur. Ces modifications dépendent de la température et de la durée du traitement mais elles sont également liées aux propriétés de la protéine et aux conditions physicochimiques de son environnement. Classiquement, la protéine perd successivement sa structure tertiaire (55–70 °C), son repliement caractéristique puis sa structure secondaire (70–80 °C), il se produit ensuite un clivage des ponts disulfures (80–90 °C), la formation de nouvelles interactions intra- et intermoléculaires, le réarrangement des liaisons disulfures (90–100 °C) et la formation d'aggrégats (100–125 °C) [10]. Ces modifications

reflètent un passage progressif à une structure désorganisée avec dénaturation de la protéine. Le chauffage, et notamment le chauffage par voie sèche, est donc, par exemple, susceptible d'affecter des épitopes conformationnels en dénaturant les protéines, ne laissant biodisponibles que des épitopes linéaires [10]. Une telle dénaturation thermique peut rendre compte de la perte de près de 90 % de l'allergénicité de certains aliments comme la noisette [11]. En revanche, elle n'explique ni la conservation de l'allergénicité de l'arachide grillée, ni a fortiori l'augmentation de son allergénicité décrite par Maleki [4].

Il faut noter que le grillage de l'arachide se fait couramment vers 140 °C pendant 40 minutes. À ces très hautes températures (supérieures à 125 °C), des modifications chimiques peuvent également intervenir qui se rajoutent aux transformations physiques que subit une protéine lors du chauffage. Il peut alors y avoir formation de liaisons covalentes entre les résidus lysine de la protéine et d'autres constituants de la matrice alimentaire conduisant à la formation d'adduits. C'est ainsi que des produits de la réaction de Maillard sont couramment formés par des interactions sucres-protéines et qu'ils peuvent contribuer à la création de néo-allergènes [12].

Dans le cas d'un chauffage par voie humide, la diminution de l'allergénicité de l'extrait d'arachides bouillies s'explique également en grande partie par la perte de protéines allergéniques qui passent de la graine à l'eau de cuisson. Ceci est démontré par électrophorèse où le spectre limité des protéines de faibles Mr, peu concentrées, dans l'extrait bouilli est compensé par l'apparition de ces mêmes entités dans l'eau de cuisson. Les mêmes observations sont faites, non plus en terme de concentration protéique mais en terme d'immuno-réactivité sur les immuno-empreintes. Beyer et al. [5] ont aussi corrélé la diminution de l'allergénicité de l'arachide bouillie vs grillée avec une diminution de la concentration estimée en Ara h 1. Dans notre étude, l'analyse des protéines présentes dans l'eau de cuisson semble également montrer l'apparition d'entités nouvelles de faibles Mr.

Lors de cette étude, nous avons observé que les différentes méthodes de préparation des arachides induisent un effet très variable et parfois important sur l'allergénicité de l'aliment final. Ces résultats soulignent que les effets des procédés technologiques sur l'allergénicité des aliments sont très complexes et dépendent de l'interaction de nombreux paramètres comme la température, la cinétique de chauffage, les caractéristiques physicochimiques du milieu. La matrice alimentaire intervient également, et notamment la composition en protéines, elle-même variable en fonction de la variété d'arachides, de ses conditions de culture, de stockage... La baisse d'immunoréactivité des arachides bouillies, associée à une spécificité des IgE de patients allergiques contre de nombreuses protéines solubilisées dans l'eau de cuisson, semble avoir un impact sur la prévalence de l'allergie à l'arachide dans les populations pour lesquelles ce mode de consommation est traditionnel. Ce procédé de chauffage par voie humide pourrait intervenir dans les procédés de transformation industriels

afin de diminuer l'allergénicité des fractions protéiques utilisées dans la préparation d'un nombre important d'aliments. Cependant, en raison de la variabilité observée, l'impact en matière de gestion et de prévention du risque allergique des aliments serait certainement limité.

Remerciements

Ces travaux ont été présentés lors des journées parisiennes d'allergie de janvier 2003 et ont reçu le prix du meilleur poster remis par la société française d'allergologie et d'immunologie clinique.

Ces travaux ont été en partie financés par le programme européen Allergest (QLK1-CT-2001-01239). Nous remercions le Docteur *Zsolt Szepfalusi*, *Dept. of Paediatrics, University of Vienna*, de nous avoir confié les sérums de deux des patients qui ont servi à cette étude.

Références

- [1] Sampson HA. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:717–28.
- [2] Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digital telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:559–62.
- [3] Emmett SE, Angus FJ, Fry JS, Lee PN. Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members. *Allergy* 1999;54:380–5.
- [4] Maleki SJ, Chung SY, Champagne ET, Raufman JP. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:763–8.
- [5] Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1077–81.
- [6] Dean TP, Clarke MC, Hourihane JO, Dean KR, Warner JO. Application of an electrophoretic methodology for the identification of low molecular weight proteins in foods. *Pediatr Allergy Immunol* 1996;7:171–5.
- [7] Wal JM, Bernard H, Yvon M, Peltre G, David B, Creminon C, Frobert Y, Grassi J. Enzyme immunoassay of human specific IgE to purified cow's milk allergens. *Food Agric Immunol* 1995;7:175–87.
- [8] Bernard H, Paty E, Mondoulet L, Burks AW, Bannon GA, Wal JM, Scheinmann P. Serological characteristics of peanut allergy in children. *Allergy* 2003 in press.
- [9] Burks AW, Williams LW, Thresher W, Connaughton C, Cockrell G, Helm RM. Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:889–97.
- [10] Davis PJ, Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 1998;53:102–5.
- [11] Hansen KS, Ballmer Weber BK, Luttkopf D, Skov PS, Wuthrich B, Bindslev-Jensen C, et al. Roasted hazelnuts allergenic activity evaluated by double blind, placebo controlled food challenge. *Allergy* 2003;58:132–8.
- [12] Chung SY, Champagne ET. Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *J Agric Food Chem* 2001;49:3911–6.