

ARTICLE ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

**ETUDE DE LA SENSIBILISATION CROISEE CARBOHYDRATE DETERMINANT (CCD).
STUDY OF CROSS REACTIVE CARBOHYDRATE DETERMINANT SENSITIZATION (CCD)**

YAPO-CREZOIT CCA¹, LOBA T^{1,2}, YAPO F² DOSSO M.¹

1 : Pôle de Biologie de l'Immunité. Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

2 : Laboratoire de Biochimie Université Félix Houphouët Boigny – Abidjan. Côte d'Ivoire.

Correspondant : Dr Yapo-Crezoit Chiayé Claire Antoinette.

27 BP 80 Abidjan 27. Côte d'Ivoire.

Email : yapoant@yahoo.fr ; yapoant1@gmail.com

RESUME :

Contexte : Les recherches en immunologie ont permis d'identifier et de caractériser les familles moléculaires d'allergènes végétaux ou animaux croissants. Ces allergènes présentent des homologies immunochimiques qui peuvent aller de la présence d'épitopes communs à l'identité de structure comme c'est le cas des cross reactive carbohydrate determinants (CCD). L'objectif de ce travail était de détecter les allergènes croissants et de déterminer le mécanisme en cause.

Méthodes : Dans le cadre d'une visite d'embauche en industrie alimentaire, le dépistage immunoenzymatique d'Ig E spécifique crevette a été réalisé en immunodot RIDA qLine® Allergy panel 1 allergènes mixtes et Allergy Panel 3 allergènes alimentaires, chez un sujet masculin de 29 ans sans symptomatologie clinique .

Résultats : La présence d'une polysensibilisation alimentaire in vitro a nécessité la réalisation d'un test complémentaire ou test d'inhibition RIDA® CCD-INHIBITOR pour le diagnostic des IgE anti-CCD

Conclusion : La connaissance de la réaction croisée permet une meilleure interprétation en Allergologie .

Mots-clés : Sensibilisation croisée CCD, Aliments, Pneumallergènes.

ABSTRACT

Background. Immunological research has identified and characterized the molecular families of plant or animal allergens. These allergens exhibit immunochemical homologies that range from the presence of common epitopes, as is the case with cross reactive carbohydrate determinants (CCDs). The main objective of this work was to detect the allergens crossing and to determine the mechanism involved.

Methods. During a visit of hiring in food industry, the immunoenzymatic detection of Ig E specific shrimp was carried out in immunodot RIDA qLine® Allergy panel 1 mixed allergens and Allergy Panel 3 food allergens, in a 29 year old male subject without clinical symptoms.

Results. The presence of food polysensitization in vitro required a complementary test or RIDA® CCD-INHIBITOR inhibition test for the diagnosis of anti-CCD IgE.

Conclusion. Cross-reaction knowledge allows better interpretation in Allergology.

Keywords: Cross Sensitization CCD, Foods, Pneumallergens.

INTRODUCTION

Le phénomène d'allergie croisée a été observé pour la première fois par Eriksson en 1978, il a constaté que les allergies alimentaires aux fruits et légumes étaient deux à trois fois plus fréquentes chez les patients souffrants d'allergies polliniques². En effet il existe plusieurs types d'allergies croisées, aliments-pneumallergènes, aliments-latex, aliments-aliments. Des auteurs ont analysé les mécanismes de ces réactions croisées et définis plusieurs orientations. Cette sensibilité croisée est due soit à l'existence d'une homologie immunochimique entre les allergènes d'espèces taxonomiquement proches ou éloignés^{1,3}, soit à l'existence de structures glucidiques d'allergènes qui peuvent présenter de fortes homologies et être à l'origine de réactions croisées avec la production d'IgE dite anti-cross réactive carbohydrate déterminants (CCD)⁴. La prise en compte des allergies croisées s'impose aujourd'hui en allergologie comme un élément indispensable dans la démarche diagnostique et thérapeutique. Ce travail s'est intéressé à mettre en évidence une sensibilité croisée aliment pneumallergènes et à identifier le mécanisme en cause

METHODES

Il s'agissait d'une étude de cas qui s'est déroulée au pôle de biologie de l'immunité de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). Le sujet âgé de 29 ans, de sexe masculin sans aucune manifestation clinique a été admis à l'Unité de Réception, d'Accueil et de Prélèvement avec un bulletin d'analyse pour la recherche d'une allergie à la crevette. Cette demande avait été effectuée dans le cadre d'une visite d'embauche pour le compte d'une firme industrielle alimentaire. Le test de dépistage de l'allergie au crevette utilise le système complet RIDA QLine qui comprend :

- **des équipements** : un agitateur orbital mélangeur-vortex à 300 tr/m (réf. art. : ZG2601), un scanner Epson perfection V 600 Photo 3D photo (Ref: *Lu4w056458*) et un ordinateur standard sur lequel est installé le logiciel de lecture RIDAqLine® Soft version 2012 pour l'évaluation des panels de RIDA qLine® Allergy

- **des réactifs** :

*Le Kit RIDA qLine®Allergy panel 1 (Ref: A6142, lot: 11395) et Kit RIDA qLine® Allergy panel 3 (Ref: A6342, lot: 14126) contenant respectivement 10 membranes de nitrocellulose par kit (Ref: A6142, lot: 11295 et A6342, lot:11116). Chaque membrane en micropuits

de réaction, est recouverte de 20 champs de matériel allergénique et de 5 standards. Les Kits RIDA qLine®Allergy permettent le dépistage immuno-enzymatique in vitro dans le sérum humain d'anticorps IgE spécifiques dirigés contre les différents allergènes de la membrane de nitrocellulose.

* Le Kit RIDA® CCD-INHIBITOR. C'est un complément du Kit RIDA qLine®Allergy C'est un test d'inhibition fiable lors de diagnostic in vitro des IgE anti-CCD contre une réaction croisée avec des déterminants glucidiques (CCD cross-reactive carbohydrate determinants). La présence de réactions positives à un nombre élevé d'allergènes pour un échantillon spécifique dans le système de test in vitro, mais aussi des divergences entre prick test de la peau et les résultats des tests sérologiques sont révélateurs de réactions faussement positives causées par les anticorps IgE anti- CCD. Dans ces cas, il est recommandé de traiter le sérum du patient avec le RIDA® CCD-INHIBITOR et répéter le test. Le RIDA® CCD-INHIBITOR se lie à la région variable des anticorps IgE et empêche les anticorps de se lier aux chaînes latérales formées de carbohydrates des allergènes dans le système de test.

- **Le matériel biologique** utilisé est du sérum humain obtenu après centrifugation à 3000 tours par mn pendant 5mn, de sang total prélevé sur un tube sec de 5ml

Le Protocole d'analyse Kit RIDA qLine®Allergy s'est déroulé comme suit : La membrane [Ref: A6142, lot: 11295 panel 1, et A6342, lot:11116 panel 3] de même les réactifs et le sérum du patient sont portés à température ambiante (20-25°C). La solution de lavage est obtenue après dilution de cinq (5) ml de Tampon de lavage concentré 25x [Wash buffer 25x ; Tris / NaCl Ref: A6142, lot: 13305 panel1, Ref: A6342, lot: 11485 panel3] dans 120 ml d'eau distillée contenue dans une éprouvette graduée. Chaque membrane [RIDA qLine® Allergy panel3 panel 1 (Ref: A6342)] est humidifiée en la recouvrant de 500 µl de ce tampon de lavage et incubée pendant 1 min sur l'agitateur orbital. La membrane est alors vidée et tapotée sur un support absorbant. Puis la membrane est remplie de 400 µl de sérum de patient et incubée pendant 30 minutes sur l'agitateur orbital et de nouveau vidée et tapotée sur un support absorbant. On procède à 3 lavages en déposant 400 µl de solution de lavage sur la membrane en agitation orbital pendant 1mn et de nouveau vidée et tapotée sur un support absorbant à la fin du 3ème lavage. La membrane est ensuite remplie de 400 µl d'anticorps anti-

humain conjugué à la biotine [(Ref: A6142, lot: 11245 panel1 et Ref A6342, lot: 11046 panel 3] et incubée pendant 45 min sur l'agitateur orbital et la même opération de lavage est appliquée comme précédemment.

Puis de nouveau la membrane est remplie de 400 µl cette fois de streptavidine conjuguée à la peroxydase [Ref: A6142, lot: 11365 panel1 ,Ref: A6342, lot: 14485 panel3] et laissée incubé pendant 20 min sur l'agitateur orbital. La membrane est rincée au-dessus d'un évier, avec 1000 ul de tampon de lavage. Cette opération est réalisée trois fois. La membrane est alors remplie de 400 ul de tampon de lavage, et laissée incubé pendant 1minute sur l'agitateur orbital, vidée et tapotée sur un support absorbant. Cette opération est réalisée deux fois. La membrane est de nouveau remplie de 400 µl cette fois de Substrat TMB (tétraméthylbenzidine) [Ref: A6142, lot: 13305 panel 1 , Ref: A6342, lot: 15475 panel 3] et laissée incubé pendant 15 minutes sur l'agitateur orbital, sous obscurité. La membrane est vidée et tapotée sur un support absorbant. La membrane est de nouveau remplie de 400 µl de tampon de lavage une fois et pour la dernière étape, une fois avec 400 µl d'eau distillée pendant 1 min chacune sur l'agitateur orbital. La membrane est vidée et tapotée sur un support absorbant . La membrane est laissée sécher au moins 30 minutes à l'air libre. Le séchage des membranes est recommandé à l'air froid. On peut exploiter les résultats lorsque le film de liquide sur la membrane s'est entièrement évaporé montrant une membrane totalement décoloré laissant paraître visible les cinq bandes de référence (standard) qui valide le test , et les bandes correspondant aux allergènes qui seront présents dans le serum (figure 1). Il est alors procédé à la lecture à l'aide d'un scanner plat en couleur 3D validé par R-Biopharm en combinaison avec le logiciel RIDA qLine® Soft. Les valeurs obtenues sont exprimées en UI/ml ou en RAST(Radio Allergo Sorbent Test).

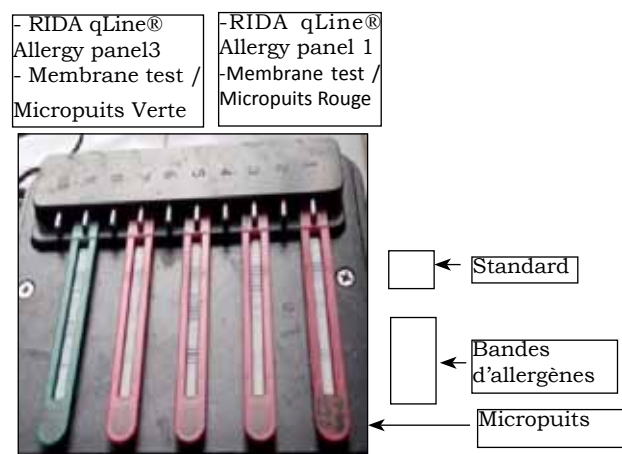


Fig. 1: Standard et bandes d'allergène des panels RIDA qLine® Allergy panel 1et Panel 3.

Le Protocole d'analyse par Test de RIDA® CCD-INHIBITOR s'est déroulé comme suit :

Avant toute utilisation le RIDA® CCD-Inhibitor doit être conservé dans son conditionnement intact entre 2 et 8° C. Pour réaliser le test, il faut sortir le kit du réfrigérateur et le laisser se réchauffer jusqu'à atteindre la température ambiante(TA) pendant environ 30 minutes . Le réactif contenu dans un tube est sous forme lyophilisé. Il est dissout avec 55µl d'eau doublement distillée et le tube est passé au vortex pendant environ 30 secondes. Ensuite le mélange obtenu est centrifugé brièvement pour s'assurer qu'aucun liquide ne reste dans le bouchon. Puis, ajouter 10µl du RIDA® CCD-INHIBITOR dissous dans 400 µl de sérum. Le mélange est remué et incubé pendant une heure à Température Ambiante sous agitation (agitateur orbital).Après incubation, le sérum humain traité est testé immédiatement selon le Protocole d'analyse Kit RIDA qLine®Allergy panel 3.

RESULTATS

L'analyse des résultats obtenus montraient que certains allergènes testés avec le RIDA qLine®Allergy panel 3 uniquement composés d'allergènes alimentaires ou trophallergènes avaient des valeurs nettement élevées et même fortes (noisette et pomme de terre) d'IgE spécifiques respectivement en UI/ ml et en RAST. Elles étaient supérieures ou égales à 3.50UI /ml et classe 3 RAST (3.50 ; 3). Ce sont la noisette F17(26.05 ;4.2) , la pomme de terre F 35 (20.92 ;4.1), la tomate F25(12.83 ;3.6) (Fig.: 2,5). Il s'agit d'une polysensibilisation . Les résultats obtenus avec le panel 3 après prétraitement du même échantillon humain avec le RIDA® CCD-INHIBITOR mettaient en évidence une baisse

importante des valeurs IgE spécifiques mais qui demeurent encore excessives surtout pour F17 noisette.

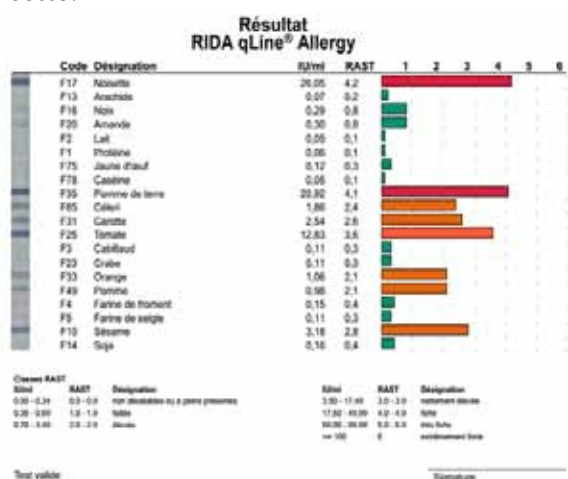


Fig 2: Résultat RIDA qLine®Allergy panel 3 sans prétraitement de l'échantillon sanguin

Les 3 allergènes précédemment concernées affichent des valeurs d'IgE respectivement de (14.84 ; 3.8) pour noisette F17, (6.88 ; 3.2), la pomme de terre F 35 et enfin (3.11 ; 2.8) pour la tomate F25 (Fig. 3,5). Cela traduit la présence dans le sérum du sujet d'un taux important IgE anti CCD dirigés contre les 3 principaux allergènes alimentaires et qui ont été neutralisé par RIDA® CCD-INHIBITOR. Quelque soient les résultats aucune sensibilisation de l'allergène

demandée n'a été relevée à savoir les crustacés (crabes, crevettes). Le RIDA qLine®Allergy Panel 1 mixte , un mélange de 7 trophallergènes et de 13 pneumallergènes, présente 2 allergènes avec des valeurs d'IgE spécifique faible respectivement en UI/ ml et en RAST .Elles étaient supérieures ou égales à 0.35 UI /ml et de classe 1 RAST (0.35 ; 1). Ce sont le mélange d'herbe Gx (0.61 ; 1.7), la carotte F 31(0.60 ;1.7) qui étaient à la limite des valeurs élevées de 0.70 UI /ml et de Classe 2 RAST. L'allergène noisette du panel 1 reste négatif à 0, 30UI /ml et classe 0,8 RAST, F17 (0.30 ; 0,8) (Fig. 4).

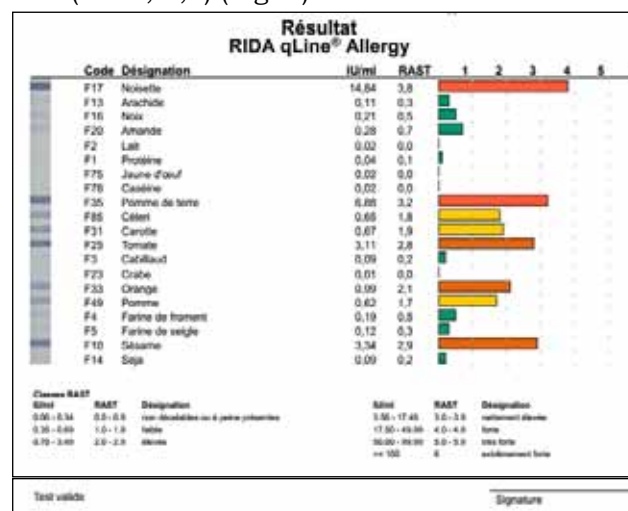


Fig 3 : Résultat RIDA qLine®Allergy panel 3 après prétraitement de l'échantillon sanguin par RIDA® CCD-INHIBITOR

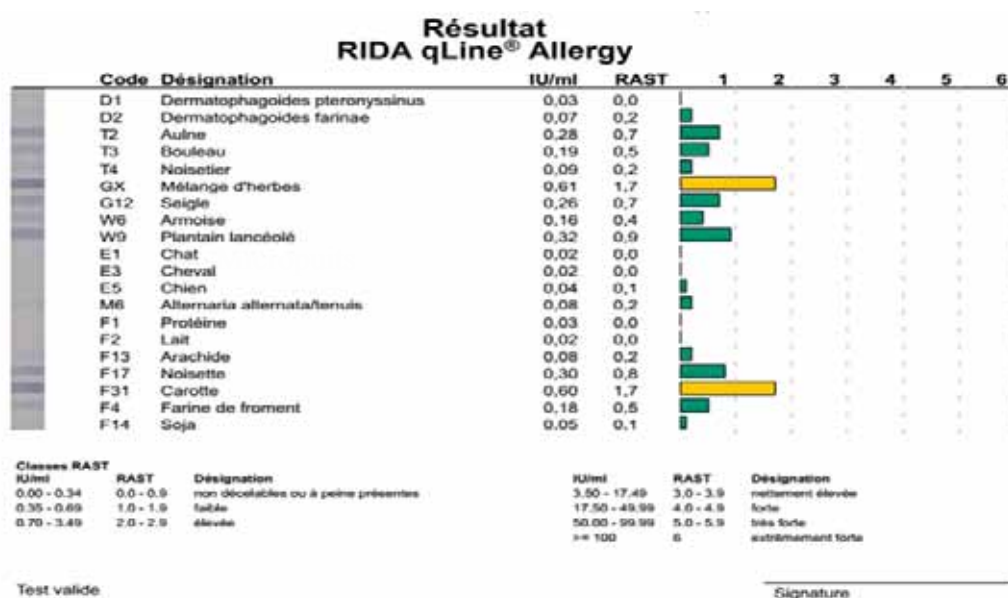


Fig 4: Résultat RIDA qLine®Allergy panel 1 sans prétraitement de l'échantillon

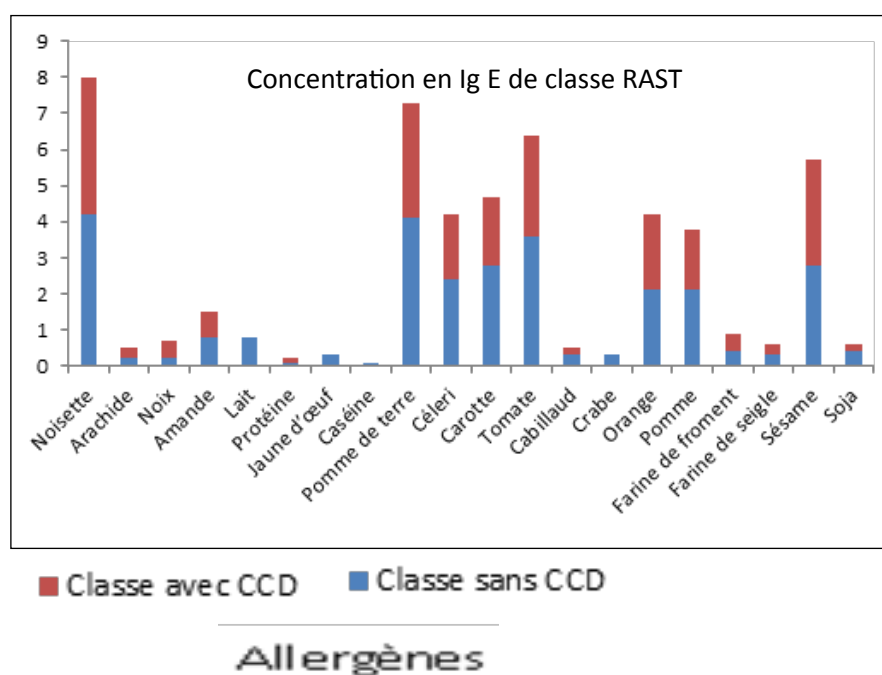


Fig 5 : Diagramme de concentration d'IgE spécifique exprimée en classe RAST par allergènes, en absence et en présence de CCDi

DISCUSSION

Notre étude nous a permis d'évaluer la concentration d'IgE spécifiques exprimée en UI/ml et en classes RAST à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique afin d'identifier les allergènes correspondants ayant les valeurs les plus élevées dans chacun des deux panels. La baisse des taux des IgE spécifiques dans les classe RAST montre que le RIDA® CCD-INHIBITOR a permis le blocage des les IgE anti CCD présent dans le sérum de notre sujet .

Cette sensibilisation a été interprétée en fonction de l'interrogatoire et des symptômes cliniques, et un lien de cause à effet sera alors établi entre la présence ou non des symptômes et la positivité du test sans omettre l'éventualité des réactions croisées. Certains IgE reconnaissent l'épitope carbohydre présente sur la protéine. Les CCD (cross-réactive carbohydre déterminants) sont des chaînes latérales d'hydrates de carbone induisant la production des anticorps IgE spécifiques.. Les CCD jouent un rôle important dans le contexte du diagnostic d'allergie. Ils décrivent des structures d'hydrates de carbones liées à des protéines responsables du phénomène de réactivité croisée des sérums des patients allergiques vers une gamme d'allergènes de plantes et d'insectes. Les réactions croisées entre pollens et aliments d'origine végétale sont essentiellement dues aux CCD⁶. Dans le

diagnostic d'allergie croisée, les anticorps IgE spécifiques dirigés contre les CCD donnent l'impression d'une polysensibilisation. Les IgE anti-CCD, cependant ne semblent pas susciter des symptômes cliniques⁷. Ces 2 observations étaient présentes dans cette étude. Cependant certains allergènes n'étaient pas influencés par le CCD inhibitor : exemple de l'allergène noisette du panel 1 qui était négatif à 0,30 UI/ml et de classe 0,8 RAST, F17 (0,30; 0,8) tandis qu'il était positif dans le panel 3 sans CCDi et avec CCDi, F17(26.05 ;4.2) F17 (14.84 ; 3.8) . Cela dépendait non seulement de la structure du CCD mais aussi de l'accessibilité de l'IgE anti-CCD et du degré de glycosylation des allergènes utilisé dans le panel1. Dans cette étude, nous avons eu des réactions croisées entre les aliments et les pneumallergènes plus précisément les pollens, c'est le cas de la pomme de terre ou de la noisette (F 35, F 17) et du mélange d'herbe (Gx) du panel1. L'exposition aux pollens semblerait être une source importante de production d'IgE croisant avec des hydrates de carbone. Il serait intéressant de déterminer si certains pollens sont plus "efficaces" que d'autres dans la production d'IgE contre les CCD. Des déterminants contenant des hydrates de carbone ont été décrits dans les pollens d'arbres et d'herbacées mais la source principale de production d'IgE anti-CCD semblerait être les pollens de graminées.

La recherche de la mise en évidence chez un patient d'IgE contre un allergène d'IgE anti-CCD peut avoir des conséquences :

- Si le patient est réellement sensibilisé à l'allergène, le test in vitro va détecter de manière indifférente les IgE contre les protéines spécifiques et contre les groupes d'hydrates de carbone de l'allergène. Le résultat positif du test s'accompagne d'une surévaluation des concentrations et donne une indication faussée.

- Si le patient n'est pas sensibilisé à l'allergène mais que le test met en évidence les IgE anti-CCD, le résultat positif du test peut être interprété comme un "faux positif clinique".

Les indications de la recherche de CCD sont exprimées comme suit dans plusieurs situations :

- Les résultats des dosages d'IgE spécifiques ne concordent pas avec l'histoire clinique (symptômes, tests cutanés) pour un patient.

- Un patient est positif vis-à-vis d'un grand nombre d'allergènes, ou polysensibilisation. Il faut noter que les patients polliniques, plus particulièrement en cas de polysensibilisations, ont un risque majeur d'avoir des IgE anti-CCD interférant dans le dosage des IgE spécifiques.

- Les différentes méthodes de diagnostic in vitro donnent des résultats discordants pour un allergène donné.

- Lorsque cela concerne 3 groupes d'allergènes; soit des aliments d'origine végétale, les légumes, fruits, graines (arachide) c'est le cas de ce patient ; soit le latex sans risque d'exposition professionnel ; soit les venins d'insectes si des tests in vitro positifs sont observés à la fois pour les venins de guêpe et d'abeille

La mise évidence d'une interférence des CCD permet aux médecins traitants d'être informé des possibles impacts de la présence d'IgE anti-CCD sur les tests in vitro. Malgré que le diagnostic de l'allergie ne puisse en aucun cas se baser uniquement sur un résultat de test in vitro, la présence d'IgE anti-CCD peut induire des erreurs dans le diagnostic des allergies aux plantes, latex et venins d'insectes. Ce type de résultat erroné peut amener à prescrire des régimes d'éviction (diètes) ou des immunothérapies inutiles^{7,8}.

CONCLUSION

La démarche diagnostique est importante pour éviter les erreurs de prise en charge par excès ou par défaut, en distinguant les authentiques allergies croisées, accompagnées par définition de signes cliniques, des sensibilisations croisées peu ou pas symptomatiques. L'allergologie moléculaire⁴ qui utilise des glycoprotéines recombinantes permettra une classification des familles biochimiques des allergènes, pour une meilleure compréhension des mécanismes de réactions croisées entre pneumallergènes et aliments.

Remerciements : Ce travail a pu être réalisé grâce à M. Marcel BONNY et les laboratoires R-Biopharm France.

REFERENCES

- 1- **Pauli G, Metz-Favre C.** Allergies croisées pollens-aliments. Rev Mals Respirat 2013; 30: 328-337.
- 2- **Fatima W.** Allergie aux acariens de la poussière domestique. Thèses de pharmacie:D4, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,2008., p65.
- 3- **Fontaine J-F.** Allergies alimentaires croisées : comment s'y retrouver ? Rev fr allergol 2000; 2(5): 380-384.
- 4- **Bienvenu J, Rouzair P, Bienvenu F.** Les allergènes moléculaires : évolution ou révolution dans le diagnostic de l'allergie. Rev fr allergol 2011; 51: 186-191.
- 5- **Syndrome oral croisé et allergies alimentaires** .<http://www.immunologyresearch.ch/ial-prof-sante-mal-allergiques-syndrome-oral-croise-et-allerg-alimentaires.htm> 14/12/2016 05:09
- 6- **Lifrani A.** Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires Mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson.. Thèse de l'institut national agronomique, paris – grignon ,2006, 159p.
- 7- **Carbohydate Cross-reactive Determinants :** Une cause majeure de réactions croisées dans les tests In Vitro pour la détermination des IgE spécifiques https://w5.siemens.com/belux/web/fr/healthcare/iagnostics_laboratoire/produits/tableaux_cliniques/Documents/Carbohydate_Crossreactivity_FR.pdf.; Siemens Medical Solutions Diagnostics ; opmaak folder 3gAllergy FR 16-09-2009 14:51 Pagina 5
- 8- **Fontaine J-F.** Allergies alimentaires croisées : comment s'y retrouver ? Rev fr allergol 2000; 52(5): 380-384.