

# Allergies alimentaires aux insectes : identification par Western blot et spectrométrie de masse



**Justine Courtois**  
Chimie Clinique

Email: [j.courtois@crig.be](mailto:j.courtois@crig.be)

# L'allergie alimentaire



= **réponse inadaptée et excessive** de notre organisme vis-à-vis d'une **substance étrangère et normalement inoffensive (allergène)**.

Une allergie s'installe en **deux étapes** :

- une étape asymptomatique, la **sensibilisation**,
- une étape marquée de symptômes cliniques, la **réaction**.



**Aucun traitement n'est disponible !**

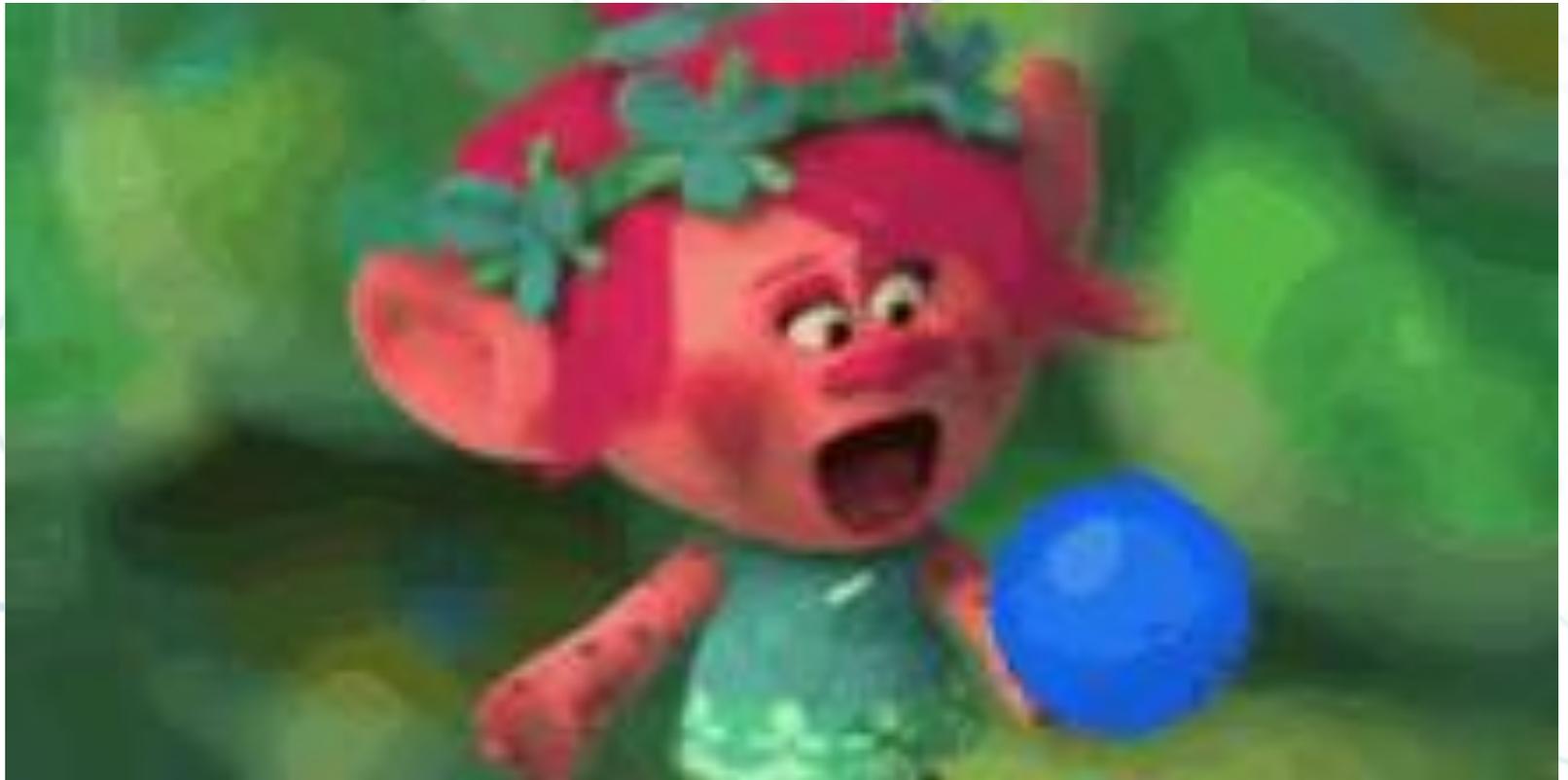
OR :

En Europe, depuis 20 ans, fréquence **X 2** des personnes allergiques.

# L'allergie alimentaire



= problème de santé publique



Nombre de personnes souffrant d'une allergie alimentaire sur terre ?



**210 000 000**

de personnes atteintes d'une allergie alimentaire



# Les réactions croisées



« Quand une personne allergique à une substance réagit à une autre substance qui n'a priori rien en commun »



**Réaction croisée entre crustacés, acariens et insectes ?**

# Les allergènes



Dans notre étude, les allergènes étudiés sont ceux de la crevette et des acariens qui sont déjà décrits et utilisés lors des diagnostics *in vitro* :

allergènes aux crevettes	allergènes aux acariens
IgEs extrait crevette	IgEs <i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>
IgEs tropomyosine (rPen a 1)	IgEs <i>Dermatophagoïdes farinae</i>
	IgEs rDer p 1
	IgEs rDer p 2
	IgEs tropomyosine (rDer p 10)

<https://www.nicelabel.com/fr/blog/2016-11-11/faqs-allergen-ingredients-food-labels/>

# Les allergies aux insectes, qu'en est-il ?



## ENTOMOPHAGY IS GLOBAL

80 percent of nations eat in insects in one way or another. That's more than 2 billion people worldwide!



Source: Food & Agriculture Organization of the United Nations

<http://www.proviam.com/>





# Les allergies aux insectes, qu'en est-il ?

## En Belgique :

LOI CE n°258/97 → abrogée le 1/01/2018

Règlement (UE) 2015/2283 : application depuis le 1/01/2018

« ...tous les produits à base d'insectes sont considérés comme Novel Food... »



Politique de tolérance mise en place pour **3 espèces d'insectes autorisées** :

- *Acheta domesticus*,
- *Tenebrio molitor*,
- *Locusta migratoria*.

# Les allergies aux insectes, qu'en est-il ?



## AVANTAGES

- Haute valeur nutritive
- Faibles ressources
- Écologique

## INCONVENIENTS

Risque allergique ?  
Angioedème ?  
Anaphylaxie ?



Pourrait conduire à la MORT ?



# Les allergies aux insectes, qu'en est-il ?



## Actuellement dans la littérature :

- 3 études ont identifié et caractérisé des allergènes des insectes comestibles
- 1 étude a évalué la prévalence des allergies parmi les insectes comestibles
- 3 études ont évalué la fréquence d'anaphylaxie après entomophagie
- 8 études ont étudié la réactivité croisée entre les insectes comestibles, les crustacés et les acariens
- 10 cas cliniques ont été rapportés concernant les allergies aux insectes après consommation



# Les allergies aux insectes, qu'en est-il ?

## Actuellement dans la littérature :

Les allergènes en cause seraient :

- Tropomyosine
- Arginine kinase
- Chitine



Impliqués dans des réactions croisées ?



**Les allergènes ne sont pas toujours des protéines**

Article of A. Barre, 2014

**1. Évaluer le risque de réaction croisée entre acariens, crustacés et insectes**

**2. Évaluer et identifier de nouveaux allergènes chez des personnes allergiques aux insectes (population africaine)**

## Objectifs du projet

**3. Développement de nouveaux outils de diagnostic  
Western blot 1D et 2D**

**4. Screening des « novel foods » contenant des insectes → contrôle de l'étiquetage**



## Matériel et Méthodes

- Sélection de 12 patients allergiques aux crustacés et/ou aux acariens : IgEs++  
→ **Mise en évidence de potentielles réactions allergiques croisées entre crustacés, acariens et insectes**

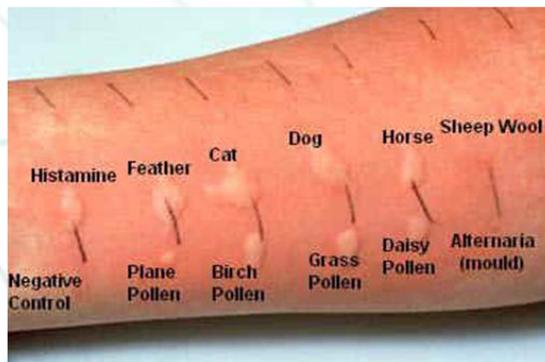
En provenance du Niger (cohortes du Dr Hamidou) :

- Réception de 47 sérums de patients allergiques aux criquets *Ornithacris turbida cavroisi* : SPT ++  
→ **Mise en évidence de profils de sensibilisation caractéristiques de l'espèce d'insecte étudiée**

# Matériel et Méthodes

## Diagnostic des allergies en routine :

- Anamnèse
- *Tests in vivo*
  - Tests cutanés (SPT)
  - Test de provocation
- *Tests in vitro*
  - Dosage des IgE spécifiques dans le sérum des patients
    - ImmunoCAP250 (ThermoFisher Scientific)
    - ImmunoCAP ISAC (microarray)



# Matériel et Méthodes

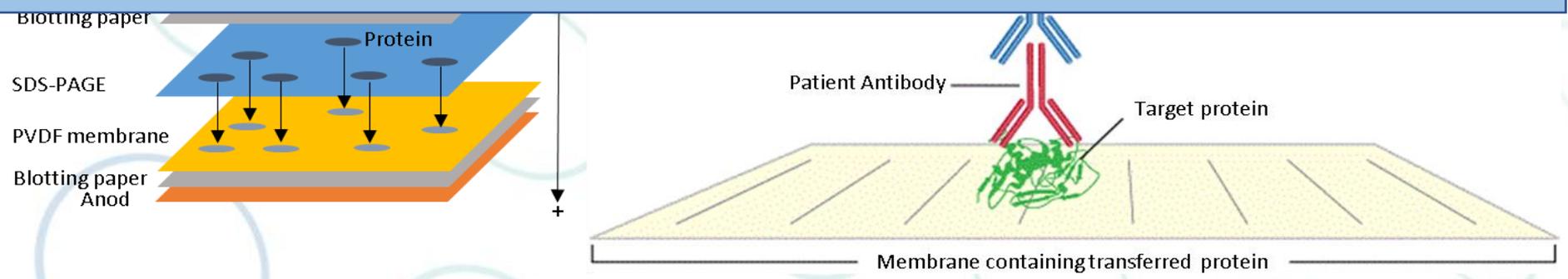


## 1. Protein extraction

## 2. 2DE Electrophoresis



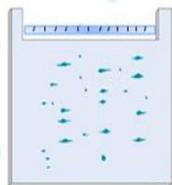
Détection de protéines contre lesquelles le patient est sensibilisé  
 → Obtention d'un profil de sensibilisation de chaque patient



# Matériel et Méthodes



## 5. SDS-PAGE



Digestion « in-gel »  
à la trypsine



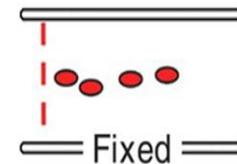
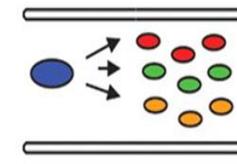
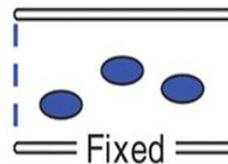
UHPLC



ESI

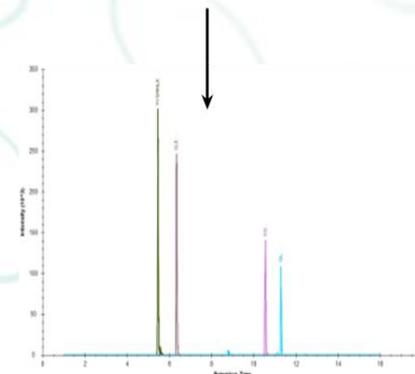


Triple quadripole MS Xevo TQS-micro (Waters)  
Mode MRM (Multiple Reaction Monitoring)  
Gradient (A: eau, B: acetonitrile + 0,1% A. formique)



Colonne Aquity UPLC Peptide BEH130, C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1x150 mm

## 6. Identification des protéines





## Étude 1 :

**1) Mise en évidence d'une potentielle réaction croisée entre crustacés, acariens et insectes (grillons)**

## Étude 2:

**2) Mise en évidence de profils de sensibilisation caractéristiques de l'espèce d'insecte étudiée - cohorte du Dr Hamidou**

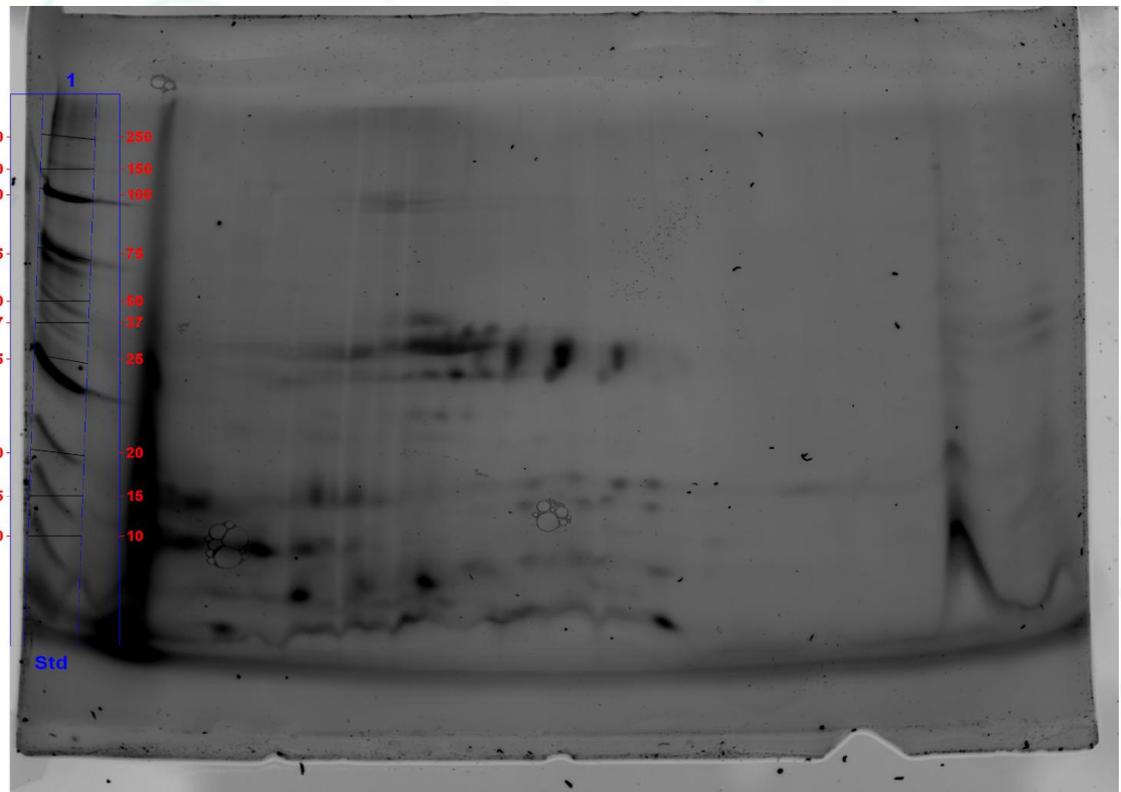
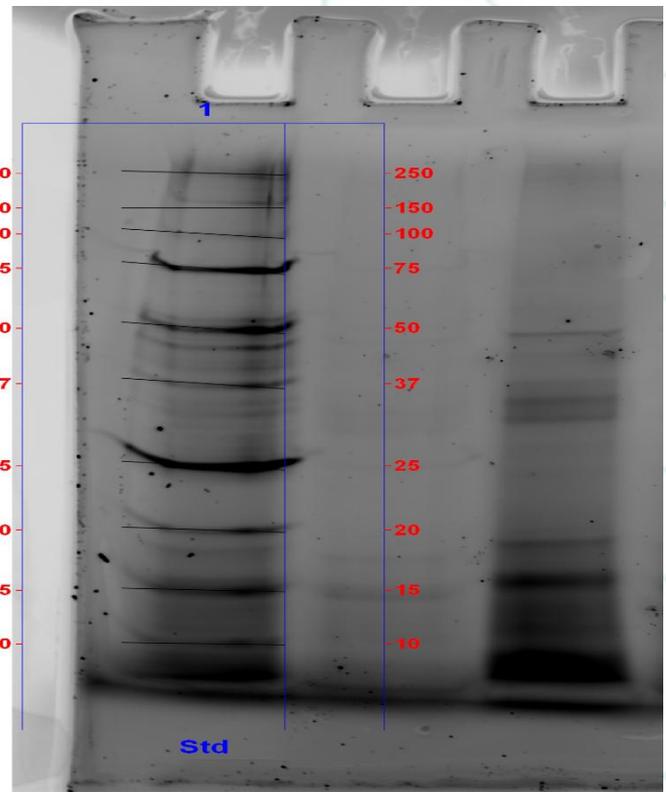
→ étude d'une population entomophage allergique aux criquets

# Résultats - Mise au point des gels 1D et 2D à partir des extraits de grillons (*Gryllodes sigillatus*)



## SDS-PAGE 1D

## SDS-PAGE 2D



SDS-PAGE1D avec extrait protéique de grillons

SDS-PAGE 2D avec extrait protéique de grillons

# Résultats – analyse de patients

Femme de 27 ans présentant une allergie aux crustacés et aux acariens

Réactions systémiques

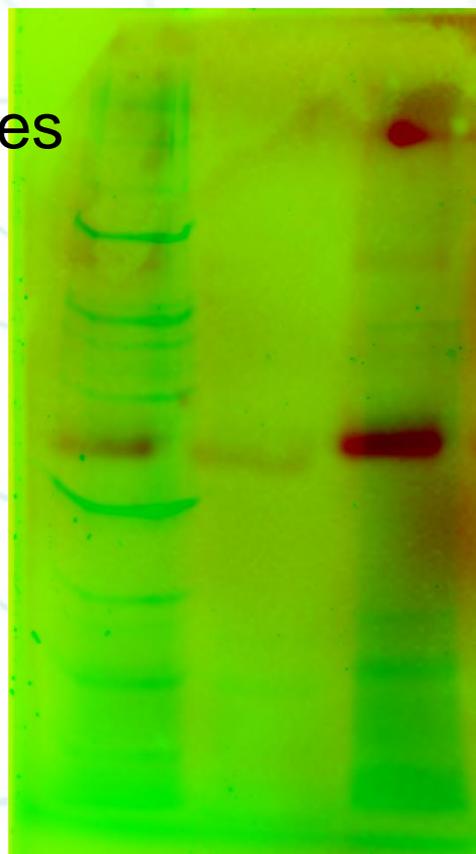
IgEs extrait crevette  
= 9.89 kUA/L

IgEs tropomyosine crevette  
(rPen a 1) = 14.3 kUA/L

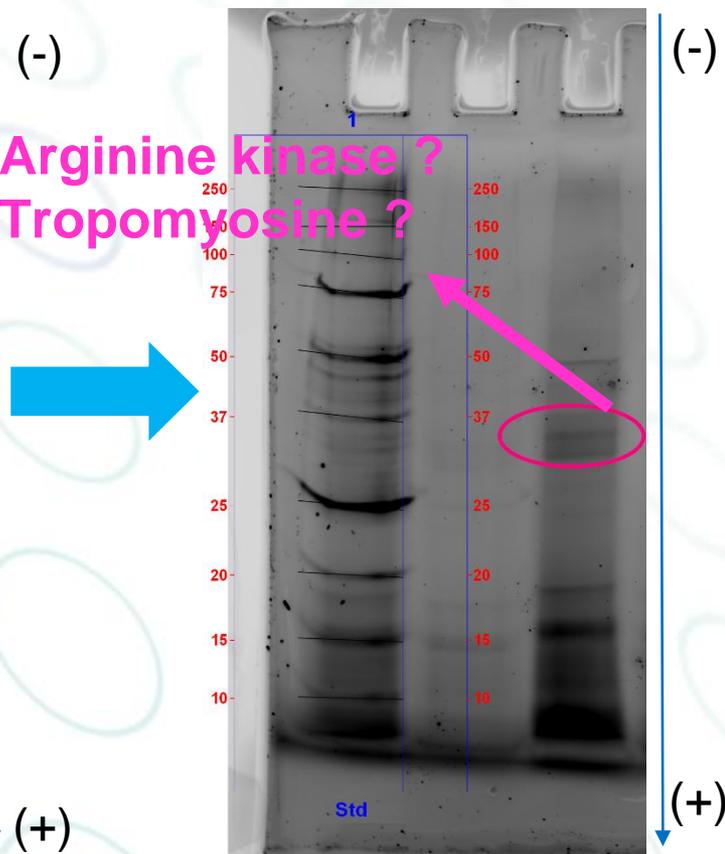
IgEs acariens (rDer p1)  
= 92.4 kUA/L

IgEs acariens (rDer p2)  
>100 kUA/L

IgEs tropomyosine acariens  
(rDer p10)  
= 16.9 kUA/L



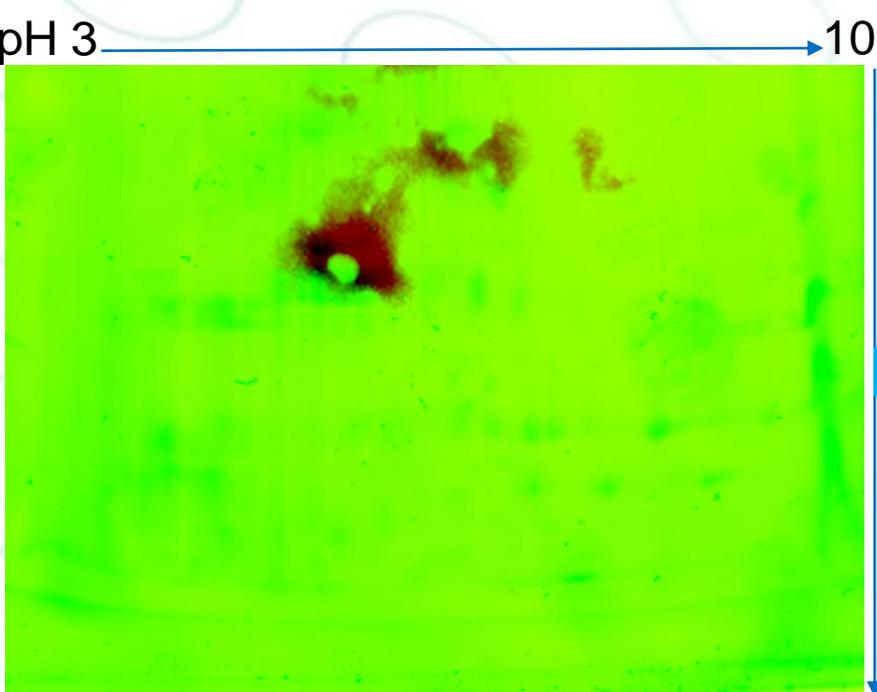
Western blot 1D avec extrait protéique de grillons



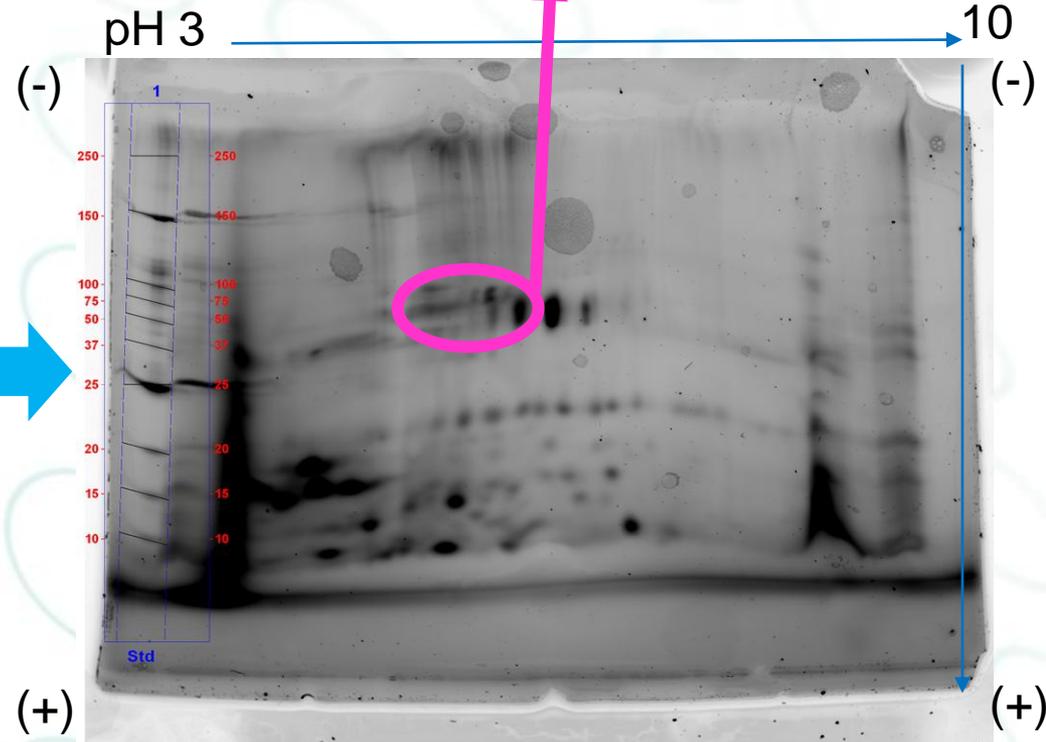
Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 1D

# Résultats – analyse de patients

## Patient 1: WB 2D



Western blot 2D avec extrait protéique de grillons



Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D

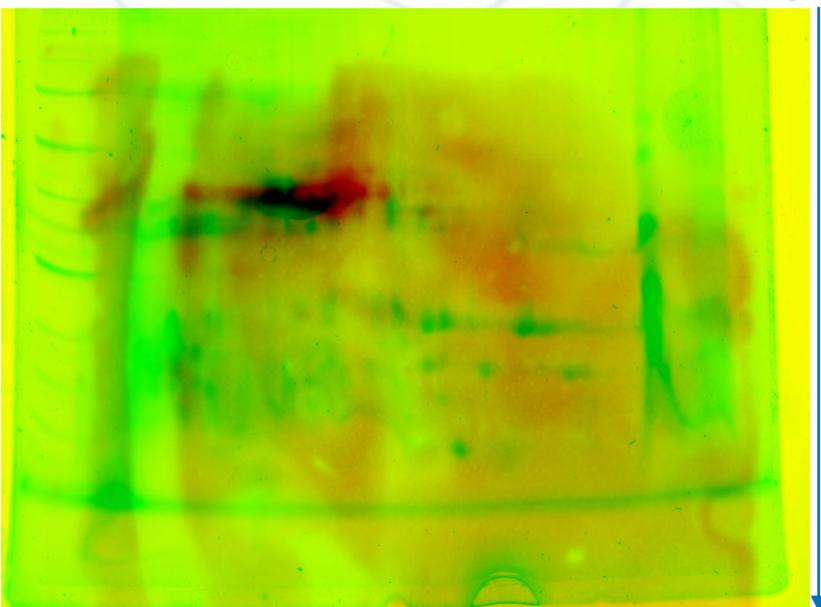
# 21 Résultats – analyse de patients

## Patient 2 : WB 2D

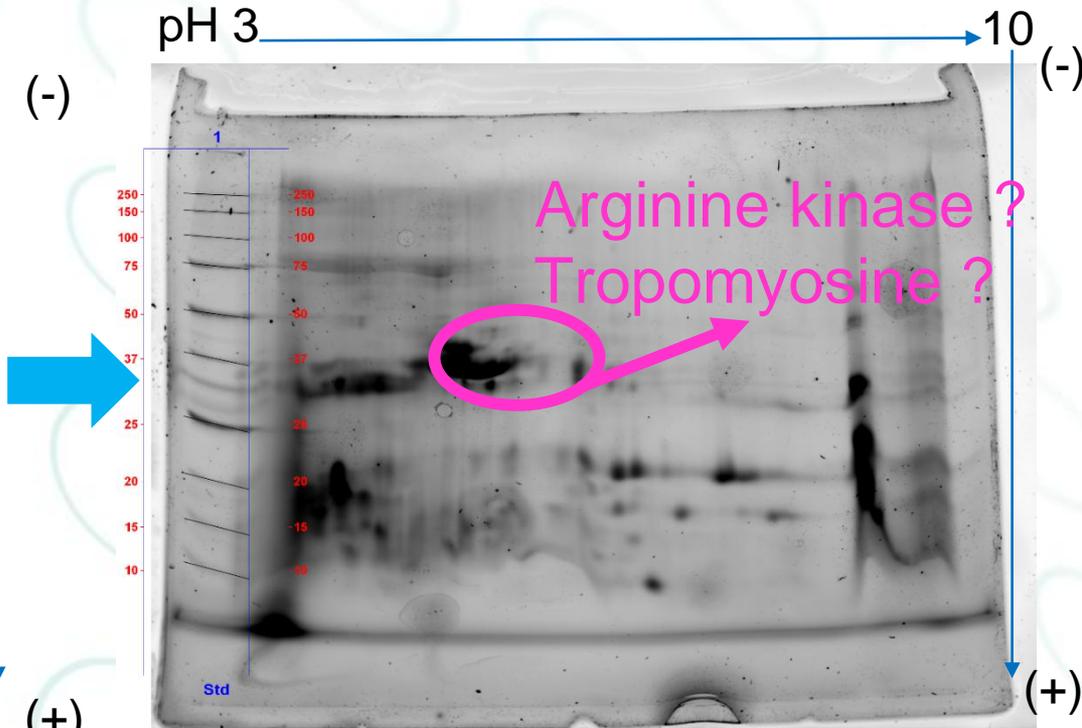


Femme de 30 ans présentant une allergie aux acariens  
Dermatite atopique

pH 3 → 10



- 37.9 kUA/L  
Western blot 2D avec extrait protéique de  
IgEs tropomyosine  
acariens (rDer p10)  
= 0.18 kUA/L



Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D





Patie

# En conclusion :

Réactions croisées IgE médiées démontrées entre les crustacés, acariens et insectes

Les... IS  
potentiel... myosine.  
Ces res... (MS).



# Résultats



## Étude 1 :

- 1) Mise en évidence d'une potentielle réaction croisée entre crustacés, acariens et insectes (grillons)

## Étude 2:

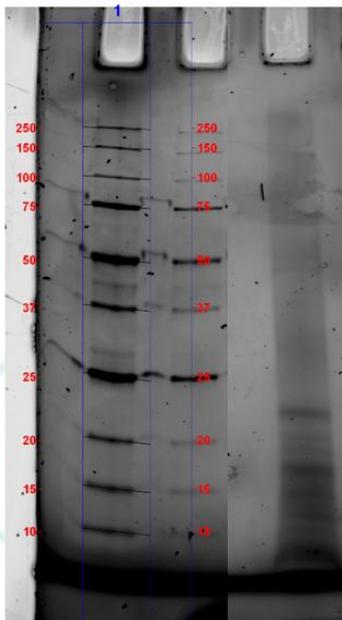
- 2) Mise en évidence de profils de sensibilisation caractéristiques de l'espèce d'insecte étudiée - cohorte du Dr Hamidou**

→ étude d'une population entomophage allergique aux criquets

# Résultats – Mise au point des gels 1D et 2D à partir des extraits de criquets *Ornithacris turbida cavroisi*

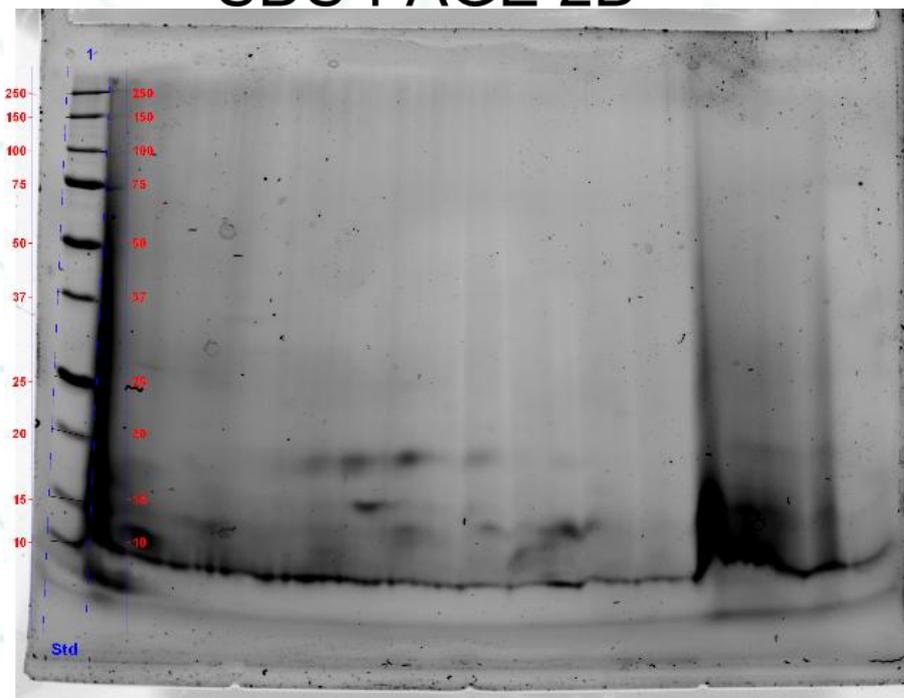


## SDS-PAGE 1D



SDS-PAGE 1D avec extrait protéique de criquets

## SDS-PAGE 2D



SDS-PAGE 2D avec extrait protéique de criquets

# 25 Résultats – analyse de patients

## Patient 1:



Homme de 40 ans présentant une allergie aux criquets, aux chenilles et aux crevettes



Choc anaphylactique de grade 2 aux criquets

Résultats des SPT :

	(+)	(-)	Criquet	Blatte	Chenille	Crevette	Acariens
Diamètre (mm)	5	0	8	6	7	10	0

Résultats dosages sIgE :

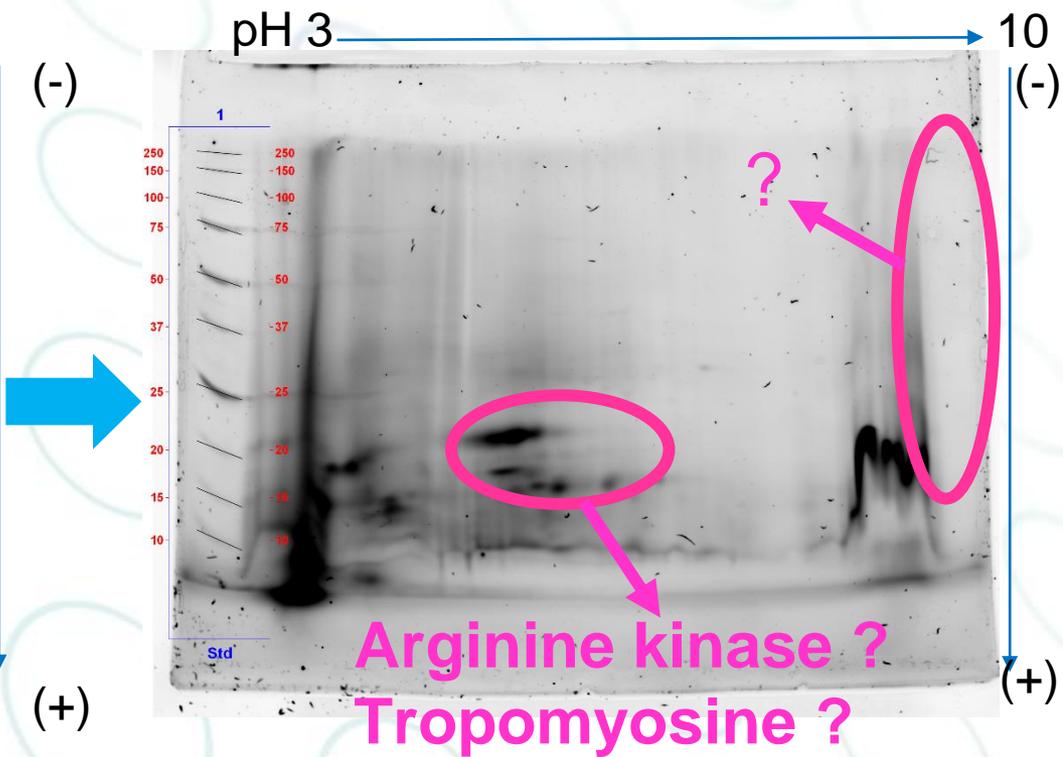
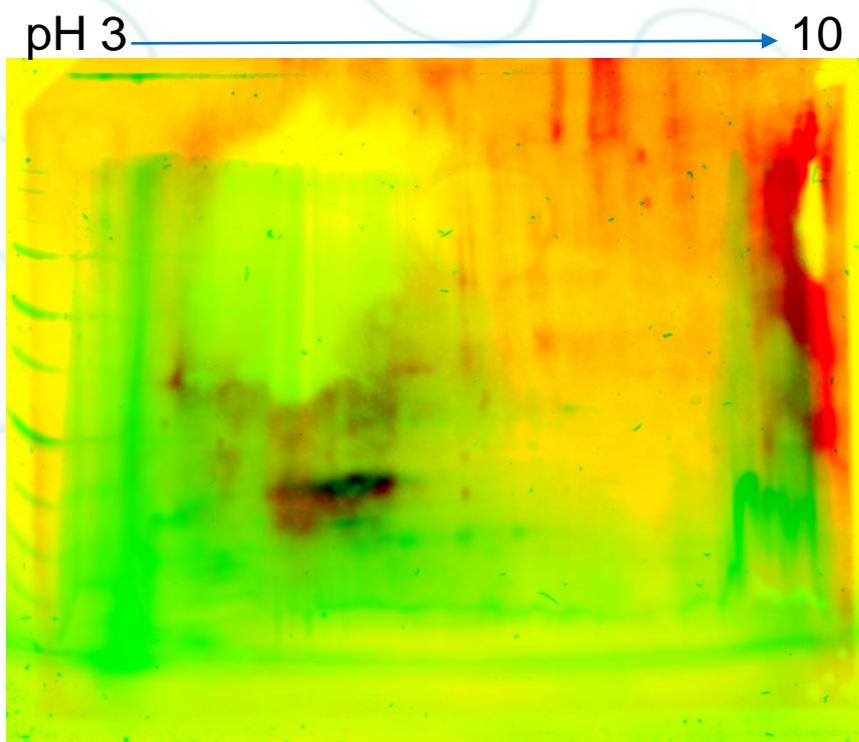
- IgEs extrait crevette = 56,7 kUA/L
- IgEs tropomyosine crevette (rPen a 1) = 0,11 kUA/L
- IgEs Derm.pteron = 5,17 kUA/L
- IgEs Derm.farinae = 5,40 kUA/L
- IgEs acariens (rDer p1) = 0,08 kUA/L
- IgEs acariens (rDer p2) = 0,05 kUA/L
- IgEs tropomyosine acariens (rDer p10) = 0,07 kUA/L



# 26 Résultats – analyse de patients

## Patient 1:

Homme de 40 ans présentant une allergie aux crickets, aux chenilles et aux crevettes  
 Choc anaphylactique de grade 2 aux crickets



Western blot 2D avec extrait protéique de crickets

Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D

# 27 Résultats – analyse de patients

## Patient 2:

Femme de 26 ans présentant une allergie aux criquets et aux crevettes

Syndrome oral, dyspnée, vertiges, hypotension, vomissement, angioedème

Résultats des SPT :

	(+)	(-)	Criquet	Blatte	Chenille	Crevette	Acariens
Diamètre (mm)	5	0	5	/	/	5	/

Résultats dosages sIgE :

IgEs extrait crevette  
= 6,71 kUA/L

IgEs tropomyosine crevette  
(rPen a 1) = 4,24 kUA/L

IgEs Derm.pteron  
= 21,4 kUA/L

IgEs acariens (rDer p1)  
= 6,75 kUA/L

IgEs tropomyosine acariens  
(rDer p10) = 6,75 kUA/L

# Résultats – analyse de patients

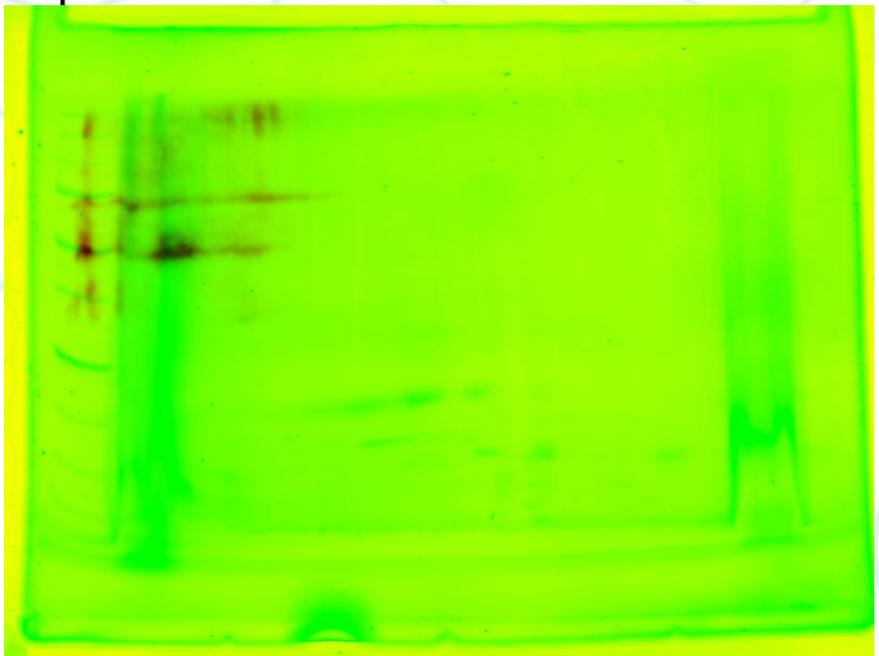


## Patient 2:

Femme de 26 ans présentant une allergie aux crickets et aux crevettes

Syndrome oral, dyspnée, vertiges, hypotension, vomissement, angioedème

pH 3 → 10

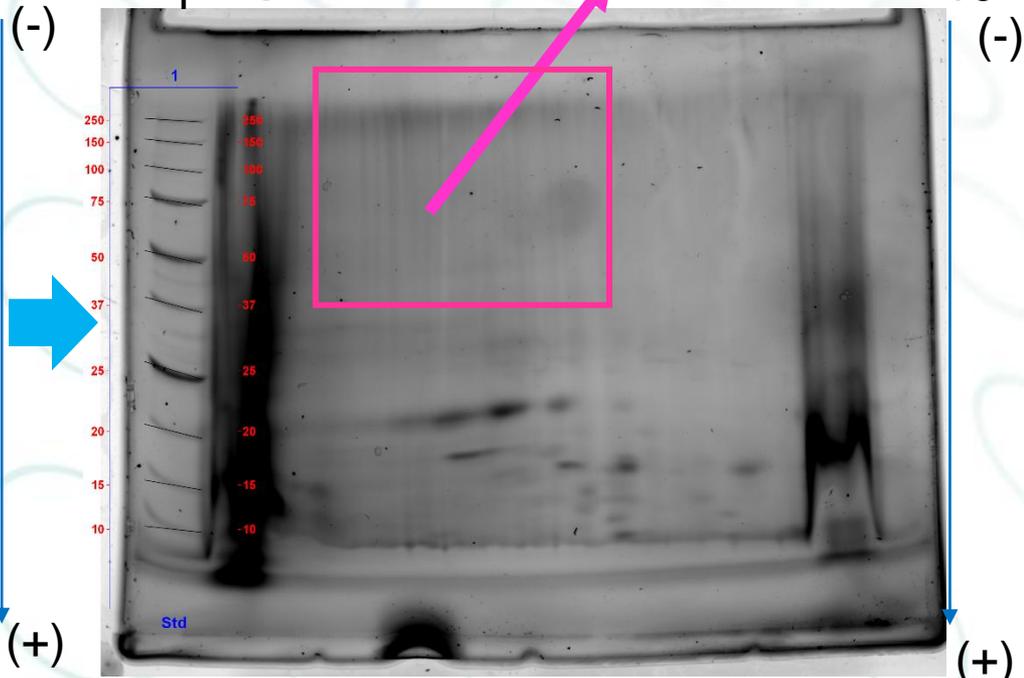


Western blot 2D avec extrait protéique de crickets



Alpha-amylase ?

pH 3 → 10



Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D



# Résultats – analyse de patients

## Patient 3:

Femme de 58 ans présentant une allergie aux criquets, aux crevettes et aux acariens

Syndrome oral, urticaire

Résultats des SPT :

	(+)	(-)	Criquet	Blatte	Chenille	Crevette	Acariens
Diamètre (mm)	6	0	7	5	/	4	5

Résultats dosages sIgE :

IgEs extrait crevette  
= 1,43 kUA/L

IgEs tropomyosine crevette  
(rPen a 1) = < 0,1 kUA/L

IgEs Derm.pteron  
= 3,14 kUA/L

IgEs tropomyosine acariens  
(rDer p10) = < 0,1 kUA/L



# Résultats – analyse de patients

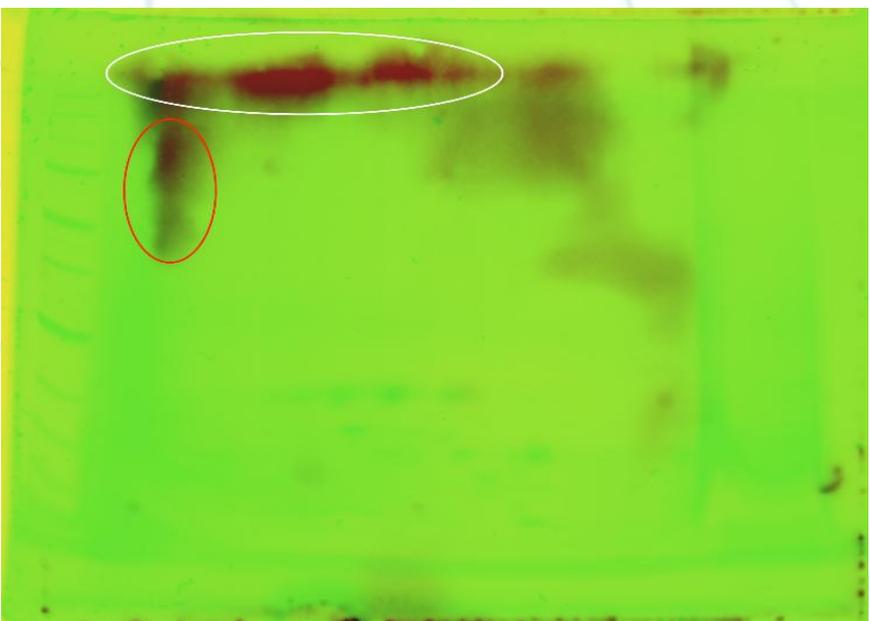


## Patient 3 :

Femme de 58 ans présentant une allergie aux criquets, aux crevettes et aux acariens

Syndrome oral, urticaire

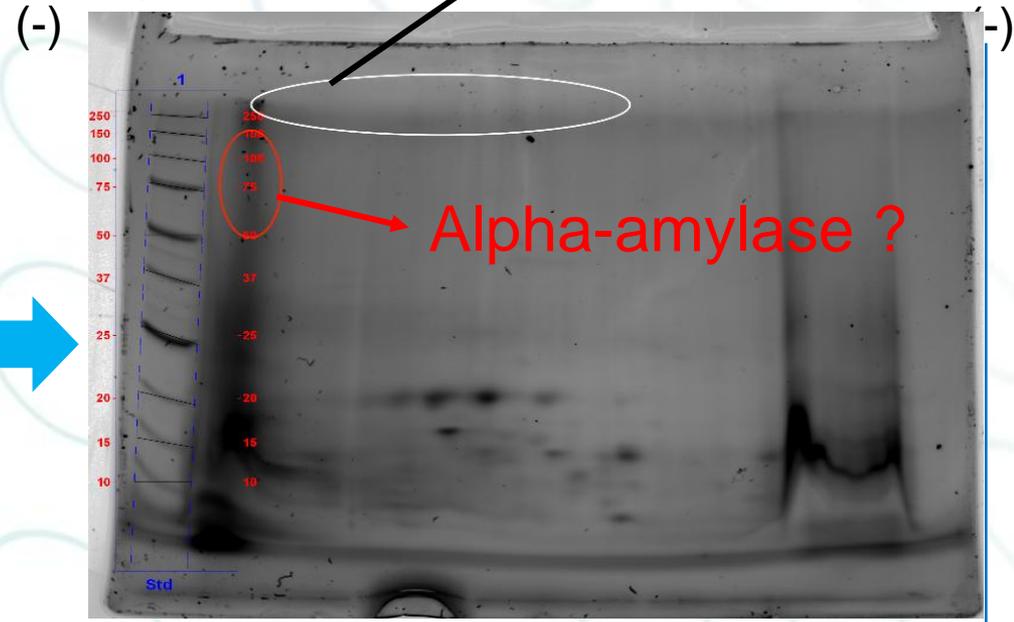
pH 3 → 10



Western blot 2D avec extrait protéique de criquets



Chitine ?  
pH 3 → 10



Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D

# 31 Résultats – analyse de patients



## Patient 4 :

Femme de 14 ans présentant une allergie aux criquets et aux blattes  
Douleurs abdominales

Résultats des SPT :

	(+)	(-)	Criquet	Blatte	Chenille	Crevette	Acariens
Diamètre (mm)	5	0	6	5	0	4	0

Résultats dosages sIgE :

- IgEs extrait crevette = 0,48 kUA/L
- IgEs tropomyosine crevette (rPen a 1) = 0,04kUA/L
- IgEs Dextrait blatte = 21,7 kUA/L
- IgEs tropomyosine acariens (rDer p10) = 0,04 kUA/L

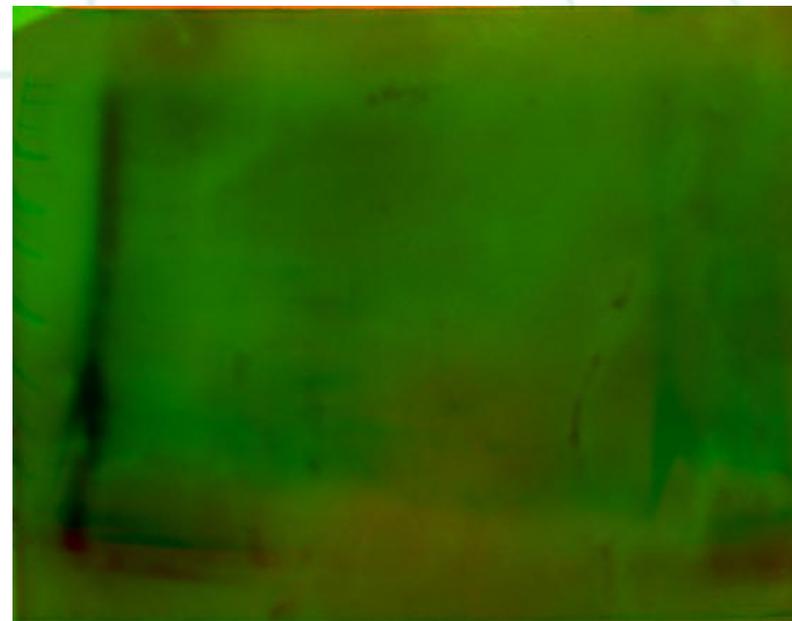
# 32 Résultats – analyse de patients

## Patient 4 :

Femme de 14 ans présentant une allergie aux criquets et aux blattes

Douleurs abdominales

pH 3 → 10



pH 3 → 10



Western blot 2D avec extrait protéique de criquets

Protéine d'intérêt (allergène) détectée par Western blot 2D

# Résultats – analyse de patients



Patient s	Age	SPT contrôle +	SPT			Hypothèse des allergènes en cause	
5	15 ans					Alpha-amylase ?	
6	31 ans						
7						Tropomyosine	
13							
14	26 ans						
15	26 ans					Alpha-amylase ? + une zone à identifier ?	
16	31 ans	5	2			Zones à identifier ?	
17	28 ans	5	0	6		Alpha-amylase ? + zones à identifier ?	
18	8 ans	4	0	4	0	0	Syndrome oral Alpha-amylase ? Chitine ?

Les allergènes impliqués dans les réactions allergiques aux crickets potentiellement en cause sont donc :

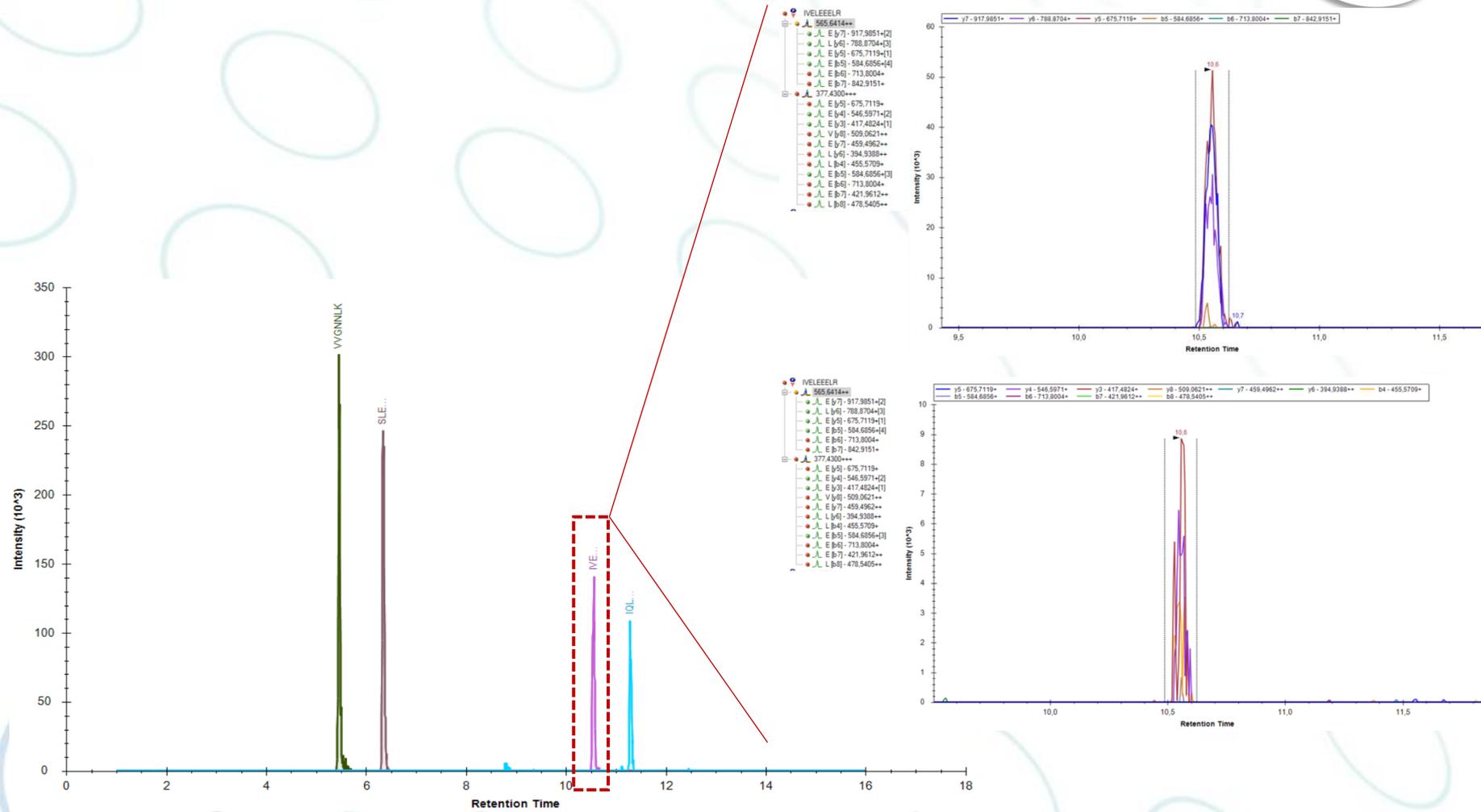
- ✓ la troponine,
- ✓ l'arginine kinase,
- ✓ la tropomyosine,
- ✓ L'alpha-amylase,
- ✓ La chitine,
- ✓ Autres protéines à identifier ?

Ces résultats sont à confirmer en spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS).

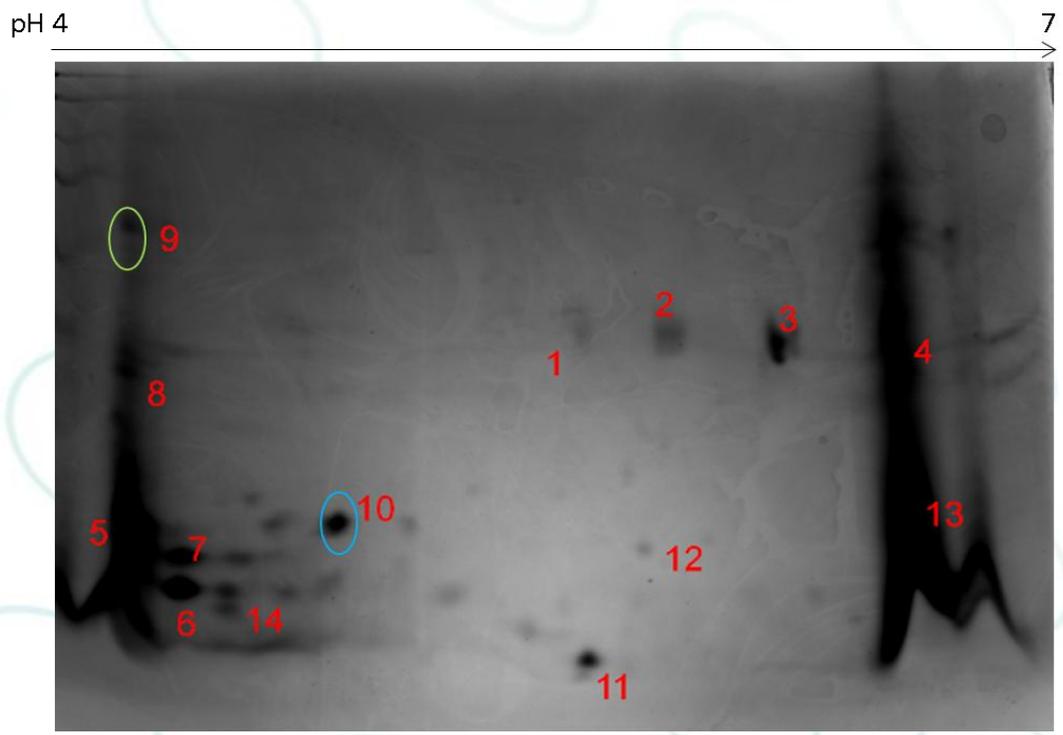
# Résultats – analyse des protéines en LC-MS/MS



## Exemple d'un chromatogramme obtenu:



# Résultats – analyse des protéines en LC-MS/MS

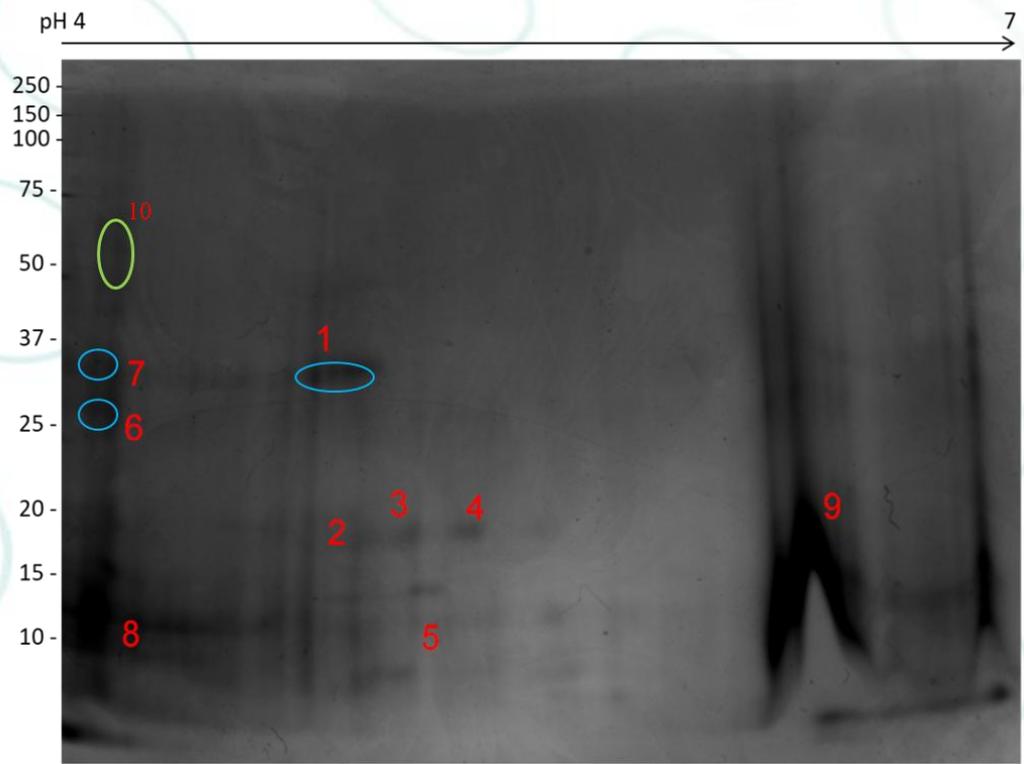


- Spot 9: **α-amylase**
- Spot 10: **chaîne légère de la myosine**



Analyse des spots protéiques en LC-MS/MS à poursuivre pour identifier d'autres protéines du grillon.

# Résultats – analyse des protéines en LC-MS/MS



cricquet

- Spots 1, 6, 7: **tropomyosine**
- Spot 10: **α-amylase**



Analyse des spots protéiques en LC-MS/MS à poursuivre pour identifier d'autres protéines du cricquet.



La méthode développée par WB 2D et LC-MS/MS dans le cadre des allergies alimentaires permet de :

- Caractériser le profil de sensibilisation du patient étudié,
- Mettre en évidence les allergènes moléculaires responsables de l'allergie,
- Mettre en évidence les allergènes moléculaires impliqués dans les réactions croisées.



Cette technique pourrait offrir des profils de sensibilisation spécifiques et individualisés aux patients pour lesquels les méthodes traditionnelles ne permettent pas un diagnostic concluant.





# Merci pour votre attention

E. Cavalier, CHU, Liège, Belgique

B. Quinting, HELMo, Liège, Belgique

S. Tollenaere, CRIG & HELMo, Liège, Belgique

R. Gadisseur, CHU, Liège, Belgique

T. Hamidou, allergologue, Niamey, Niger

X. Van der Brempt, Allergopôle, Clinique Saint-Luc, Bouge, Belgique

À l'équipe E2 du Service de Chimie Clinique, CHU, Liège, Belgique, principalement A-C

Bekaert, O. Rousselle, S. Kovacs, V. Castiglione



**Chimie Clinique**  
Université de Liège  
Liège, Belgique

Email: [j.courtois@crig.be](mailto:j.courtois@crig.be)

