



**UNIVERSITE PARIS V - RENE DESCARTES**

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques**

**Ecole doctorale n°436 – Médicament Toxicologie Chimie Environnement**

**Année : 2012**

**N°**

**THESE**

**Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**Discipline : Toxicologie**

**Présentée et soutenue publiquement le 29 Octobre 2012**

**par**

**Stéphanie MORIN**

**INFLUENCE DE LA PRESENCE ET DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE  
INTESTINAL SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA PREVENTION DES  
ALLERGIES ALIMENTAIRES**

*Directeur de thèse : Jean-Michel WAL*

*Travail réalisé au Laboratoire INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire (UR 496)  
IBiTecS/SPI bât 136 CEA de Saclay 91191 Gif sur Yvette Cedex*

**MEMBRES DU JURY**

**Pr Jean-Louis BRESSON, Université PARIS DESCARTES..... Président**  
**Pr Philippe EIGENMANN, Hôpital Universitaire de Genève ..... Rapporteur**  
**Dr Philippe GERARD, INRA Jouy en Josas ..... Rapporteur**  
**Dr Jean FIORAMONTI, INRA Toulouse..... Examineur**  
**Dr Stéphane HAZEBROUCK, INRA Jouy en Josas ..... Examineur**  
**Dr Jean-Michel WAL, INRA Jouy en Josas ..... Directeur de thèse**

## **Influence de la présence et de la composition du microbiote intestinal sur le développement et la prévention des allergies alimentaires**

Le développement de l'allergie peut être influencé par le microbiote intestinal qui est impliqué dans la maturation du système immunitaire de l'hôte lors de la colonisation du tractus digestif dès la naissance. L'objectif de mon travail a été d'étudier l'impact du microbiote intestinal sur le développement d'une sensibilisation allergique à des protéines de lait de vache à l'aide d'un modèle de souris BALB/c gnotoxéniques.

Dans une première étude, nous avons montré que les souris axéniques (Ax, sans germe) sont plus réactives que les souris conventionnelles (CV) au potentiel immunogénique et allergénique de la  $\beta$ -lactoglobuline (BLG) et de la caséine (CAS), lorsque ces deux protéines sont injectées intrapéritonéalement sans adjuvant. A l'aide d'un autre modèle de sensibilisation par voie orale au lait, nous avons confirmé que les souris Ax développent des réponses IgE contre la BLG plus fortes que celles des souris CV. Les mécanismes de sensibilisation contre la BLG et la CAS sont alors différemment affectés par la présence ou non d'un microbiote intestinal. Par ailleurs, une colonisation tardive du tractus digestif de souris Ax à l'âge de 6 semaines par le microbiote de souris CV induit chez les souris conventionnalisées (CVd) le développement, après sensibilisation, de réponses humorales toujours plus fortes que celles observées chez les souris CV. A l'inverse, une conventionnalisation des souris Ax au moment du sevrage à l'âge de 3 semaines, induit un niveau de sensibilisation plus faible que celui des souris CV. Dans ce cas, des différences de composition du microbiote intestinal entre souris CV et CVd pourraient jouer un rôle dans le faible niveau de sensibilisation des souris CVd. Nous avons enfin évalué l'impact de l'implantation dès la naissance d'une souche de *Lactobacillus casei* en monoxénie (souris Mx). La réponse humorale contre la CAS, mais pas contre la BLG, est alors significativement plus élevée chez les souris Mx que chez les souris Ax.

Ces différentes études suggèrent que l'influence du microbiote sur le développement d'une sensibilisation aux protéines du lait de vache diffère selon les allergènes et selon le mode d'exposition aux allergènes. Ces résultats soulignent également qu'un retard de colonisation du tractus digestif peut perturber durablement la réactivité du système immunitaire à une sensibilisation contre des antigènes alimentaires.

**Mots-clés :** Allergie / Lait de vache /  $\beta$ -Lactoglobuline / Caséines / Microbiote intestinal/ *L. casei*

## **Role of gut microbiota and its composition on the development of food allergies**

The development of allergic responses can be influenced by the gut microbiota, which critically stimulates the maturation of the host immune system during colonization of the digestive tract at birth. We thus aimed to study the impact of the gut microbiota on the development of an allergic sensitization to cow's milk proteins by using a gnotobiotic BALB/c mouse model.

First, we showed that germ-free (GF) mice are more responsive than conventional mice (CV) to the immunogenic and allergenic potential of  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and casein (CAS) when these proteins are injected intraperitoneally without adjuvant. With another model of oral sensitization to cow's milk, the development of higher BLG-specific IgE responses in GF mice compared to CV mice was confirmed. We also observed that the mechanisms leading to oral sensitization to BLG and CAS are differentially affected by the absence of gut microbiota. Furthermore, a delayed colonization of the digestive tract of 6-week-old GF mice by a conventional microbiota was studied. The conventionalized mice (CVd) still developed, after sensitization, higher antibody responses than those measured in CV mice. In contrast, GF mice conventionnalized just after weaning, at 3 week of age, displayed a level of sensitization lower than that of CV mice. Differences in the gut microbiota composition evidenced between CVd and CV mice could also play a role in the lower level of sensitization of CVd mice. Finally, we evaluated the impact of the neonatal mono-colonization of mice by a strain of *Lactobacillus casei*. The antibody responses against CAS, but not against BLG, were then significantly higher in mono-associated mice than in GF mice.

These studies suggest that the influence of microbiota on the development of sensitization to cow's milk proteins depends on the nature of the allergens and the mode of exposure. These results also underline that delayed bacterial colonization altered persistently the host immune response to oral sensitization against food antigens.

**Keywords:** Allergy / Cow's milk /  $\beta$ -Lactoglobulin / Caseins / Gut microbiota / *L.casei*

## **REMERCIEMENTS**

J'ai eu le plaisir de réaliser ma thèse dans l'Unité INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA), implantée au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) / Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse (LERI) du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Saclay. Cette thèse a été financée par l'INRA.

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury de ma thèse. Le Pr Philippe Eigenmann et le Dr Philippe Gérard pour avoir accepté le rôle de rapporteur de ma thèse ainsi que le Pr Jean-Louis Bresson et le Dr Jean Fioramonti, qui me font également l'honneur de juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Stéphane Hazebrouck qui m'a encadré tout au long de ma thèse ainsi qu'à mon directeur de thèse le Dr Jean-Michel Wal (Directeur de l'UIAA). Je les remercie chaleureusement pour leur accueil au sein de l'équipe ainsi que pour le temps qu'ils m'auront consacré durant ma thèse.

Je remercie également le Dr Christophe Créminon (Chef de Service, SPI) et le Dr Hervé Volland, pour leur accueil au sein du service et du laboratoire.

Je remercie aussi, les membres de mon comité de thèse, le Dr Sylvie Rabot, le Dr Saadia Kerdine-Römer et le Dr Fabien Magne pour leurs judicieux conseils et leur disponibilité.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers tous les membres de mon équipe l'UIAA. Je remercie le Dr Karine Adel-Patient, le Dr Hervé Bernard et le Dr Romy Fischer pour leur disponibilité, leur aide, leurs remarques pertinentes et leurs encouragements. Sans oublier, Laéticia Przybylski-Nicaise (merci pour ton aide et ton soutien concernant l'IHC), Sandrine Ah-Leung (merci pour la culture cellulaire et pour m'avoir transmis tes astuces pour une saignée réussie), Blanche Guillon et Marie-Françoise Drumare, (mes «voisines» de paillasses avec qui j'ai beaucoup apprécié de discuter), Stéphane Nano (merci pour tes fameux encouragements) et Sophie Wavrin (merci pour les petits moments de détente ainsi que pour ton soutien).

Je remercie aussi les membres de l'Institut MICALIS de l'INRA de Jouy en Josas et en particulier son animalerie gnotoxénique ANAXEM, notamment, Pascal Guillaume, Chantal Bridonneau, Amandine Descamp, Benoit Lignon-Couffon, Anne Foussier et Fatima Joly pour leur sympathie, leur aide et la mise à disposition des outils nécessaires à mes travaux de recherches. J'ai une pensée particulière pour Tiphaine Leroy, ancienne doctorante de MICALIS qui m'a initié à la FISH.

Je remercie également Guillaume Piton et Stéphan Bouet, pour m'avoir formé à l'immunohistochimie. Un grand merci à vous pour votre disponibilité, vos conseils indispensables et votre gentillesse.

Je tiens à remercier tous les actuels et anciens occupants du SPI. Notamment mes collègues de bureau, Julie, Jérôme et Hervé. Mais aussi, Stéphanie, Nathalie, Ingrid, Céline, Nicolas, Anne, Mazhoura, Patricia, Marie-Claire, Marc, Karine et Mélanie. Je n'oublie pas

Fabienne, Julie, Laura et Narimane. Je vous remercie pour votre soutien, l'attention dont vous avez fait preuve à mon égard et l'ambiance joviale si agréable.

Une pensée pour tous ceux que j'ai rencontrés au cours de mon long parcours d'étudiante (amis, collègues, professeurs, maîtres de stage...).

Je n'oublie pas mes chers amis, qui ont toujours été présents et surtout mon meilleur ami et bien plus encore, Teddy avec qui j'ai tout partagé.

Je pense aussi à toute ma famille, loin des yeux mais si près du cœur!

Pour finir je remercie infiniment mes parents, j'ai une tendre pensée pour ma douce qui m'a transmis sa curiosité, le goût d'apprendre et qui m'a toujours encouragée et soutenue. Je suis ton précieux conseil, je m'accroche à mon étoile...

## **ABBREVIATIONS**

$\alpha$ -Lac.....	$\alpha$ -Lactalbumine
Ax.....	Axénique
BLG.....	$\beta$ -Lactoglobuline
CAS.....	Caséine entière
CMH.....	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA.....	Cellule Présentatrice d'Antigène
CV.....	Conventionnelle
CVd.....	Conventionnalisé
ELISA.....	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
Fc $\epsilon$ RI.....	Récepteur de haute affinité pour les IgE
Fc $\epsilon$ RII.....	Récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23)
FISH.....	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
GALT.....	Gut Associated Lymphoid Tissue
GF.....	Axénique (Germ Free)
IFA.....	Incomplet Freund Adjuvant
IFN.....	Interféron
Ig.....	Immunoglobuline
i.g.....	intra-gastrique
i.p.....	intra-péritonéal
IL.....	Interleukine
LB.....	Lymphocyte B
LT.....	Lymphocyte T
<i>L.casei</i> .....	<i>Lactobacillus casei</i>
Mx.....	Monoxénique
MLN.....	Ganglions mésentériques (Mesenteric Lymph Nodes)
PBS.....	Phosphate Buffer Saline
SAB/BSA.....	Sérum Albumine Bovine
Th.....	Cellule T auxiliaire (T helper)
TPO.....	Test de Provocation orale
TTGE.....	Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis
UA.....	Unité d'absorbance
UHT.....	Ultra High Temperature

<b>I. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE .....</b>	<b>14</b>
<b>I.1. HISTORIQUE .....</b>	<b>14</b>
<b>I.2. DEFINITIONS ET CLASSIFICATIONS .....</b>	<b>15</b>
<b>I.3. EPIDEMIOLOGIE ET PREVALENCE .....</b>	<b>17</b>
<b>I.4. MECANISME DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE.....</b>	<b>20</b>
I.4.1. Les acteurs impliqués dans le mécanisme de la réaction allergique.....	20
I.4.1.1. Les immunoglobulines de type E et leurs récepteurs.....	20
I.4.1.2. Le système immunitaire associé à l'intestin .....	21
I.4.1.2.a. Les cellules M (microfold cells ou cellules membraneuses) .....	23
I.4.1.2.b. Les cellules présentatrices d'antigènes .....	24
I.4.1.2.c. Les entérocytes .....	25
I.4.1.2.d. Les lymphocytes.....	25
I.4.1.2.d.i. Les lymphocytes T.....	25
I.4.1.2.d.ii. Les lymphocytes B.....	28
I.4.1.2.e. Les cellules effectrices.....	28
I.4.1.2.e.i. Les mastocytes .....	28
I.4.1.2.e.ii. Les basophiles.....	29
I.4.1.2.e.iii. Les éosinophiles.....	29
I.4.1.3. Le système immunitaire inné associé à l'intestin.....	30
I.4.2. Description du mécanisme de l'allergie alimentaire .....	31
I.4.2.1. Exposition à l'allergène .....	31
I.4.2.2. Première étape : la phase de sensibilisation .....	31
I.4.2.3. Deuxième étape : la phase de déclenchement.....	32
I.4.3. Régulation du mécanisme.....	33
<b>I.5. SYMPTOMES CLINIQUES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE.....</b>	<b>36</b>
<b>I.6. ASPECTS THERAPEUTIQUES .....</b>	<b>38</b>
<b>I.7. FACTEURS DE RISQUES .....</b>	<b>39</b>
I.7.1. Les allergènes alimentaires.....	40
I.7.1.1. Généralités .....	40
I.7.1.2. Les protéines et allergènes du lait de vache.....	40
I.7.2. Facteurs génétiques.....	44
I.7.3. Influence de l'âge et du sexe .....	45
I.7.4. Influence de l'environnement.....	46
I.7.4.1. Facteurs épigénétiques .....	47
I.7.4.2. Influence de l'allaitement .....	48
I.7.4.3. L'hypothèse hygiéniste .....	49

<b>II. LE MICROBIOTE INTESTINAL.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1. DEFINITION.....</b>	<b>50</b>
<b>II.2. METHODE D'ANALYSE DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>51</b>
II.2.1. Méthodes basées sur la culture .....	51
II.2.2. Les méthodes moléculaires.....	52
II.2.2.1. Les méthodes d'empreintes.....	53
II.2.2.2. L'hybridation in situ couplée à la cytométrie en flux .....	54
II.2.2.3. La PCR quantitative (qPCR).....	54
II.2.2.4. Les méthodes de séquençage .....	55
II.2.2.4.a. <i>La technique de séquençage complet</i> .....	55
II.2.2.4.b. <i>La technique de pyroséquençage</i> .....	55
II.2.2.5. La métagénomique.....	55
<b>II.3. COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>56</b>
<b>II.4. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DU MICROBIOTE INTESTINAL .....</b>	<b>59</b>
<b>II.5. FACTEURS AGISSANT SUR LA COLONISATION BACTERIENNE .....</b>	<b>60</b>
II.5.1. Influence du terrain génétique .....	61
II.5.2. Influence du terme de naissance .....	61
II.5.3. Influence du mode d'accouchement .....	61
II.5.4. Influence de l'alimentation.....	62
II.5.5. Influence des traitements médicamenteux.....	63
II.5.6. Influence des conditions d'hygiène .....	63
<b>II.6. FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL.....</b>	<b>64</b>
II.6.1. Fonctions métabolique et nutritionnelle .....	65
II.6.2. Fonction protectrice .....	66
II.6.3. Fonction immunologique.....	67
II.6.3.1. Immunité anté-natale.....	68
II.6.3.2. Immunité post-natale .....	68
II.6.3.3. Interactions hôte-microbiote et stimulation de l'immunité innée .....	69
<b>III.CONTEXTE DU SUJET DE THESE : MICROBIOTE</b>	
<b>INTESTINAL ET ALLERGIE .....</b>	<b>74</b>
<b>III.1. MICROBIOTE INTESTINAL ET PATHOLOGIES .....</b>	<b>74</b>
<b>III.2. RELATIONS ENTRE MICROBIOTE INTESTINAL ET ALLERGIES</b>	
<b>ALIMENTAIRES .....</b>	<b>74</b>
III.2.1. Microbiote intestinal et maladies allergiques .....	74
III.2.2. Données expérimentales sur l'influence du microbiote intestinal dans le	
développement de l'allergie et l'acquisition de la tolérance aux aliments .....	76

<b>III.3. MODELES EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>79</b>
III.3.1. Méthodes d'études du microbiote intestinal .....	79
III.3.2. Méthodes d'études de l'allergie alimentaire.....	80
III.3.2.1. Les modèles murins .....	81
III.3.2.2. Sensibilisation expérimentale .....	82
III.3.2.3. Déclenchement expérimental de la réaction allergique (challenge) .....	84
<b>IV.OBJECTIFS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>85</b>

<b>RESULTATS DES TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>87</b>
---	-----------

<b>I.Mise en évidence du potentiel allergénique et immunogénique de la <math>\beta</math>-lactoglobuline et des caséines bovines chez la souris BALB/c, en absence d'adjuvant .....</b>	<b>87</b>
I.1. CONTEXTE DES TRAVAUX.....	87
I.2. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE.....	89
I.3. PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS.....	90
<b>II.Impact de la colonisation du tractus digestif à l'âge de 6 semaines sur la sensibilisation au lait de vache.....</b>	<b>113</b>
II.1. CONTEXTE DES TRAVAUX.....	113
II.2. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE.....	114
II.3. PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS.....	115
<b>III.Impact de la colonisation du tractus digestif au moment du sevrage sur la sensibilisation au lait de vache .....</b>	<b>143</b>
III.1. INTRODUCTION.....	143
III.2. MATERIELS ET METHODES .....	144
III.2.1. Milieux et réactifs .....	144
III.2.2. Souris : Origine et conditions d'élevage.....	144
III.2.3. Protocole expérimental .....	144
III.2.4. Hybridation <i>in situ</i> couplée à la cytométrie en flux (FISH : Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization) .....	146
III.2.5. Dosage des anticorps spécifiques dans les échantillons sanguins et fécaux...	149



III.2.6.	Dosage des protéases mastocytaires de type 1 (mouse Mast Cell Protease 1 (mMCP-1)) .....	149
III.2.7.	Réactivation des cellules issues des rates et des ganglions mésentériques et dosage des cytokines .....	149
III.2.8.	Analyses statistiques.....	150
<b>III.3.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>151</b>
III.3.1.	Analyse de la composition du microbiote fécal.....	151
III.3.2.	Réponses anticorps induites par la sensibilisation expérimentale .....	153
III.3.3.	Réponses induites par le challenge oral.....	155
III.3.4.	Réponses cellulaires (sécrétion de cytokines après réactivation <i>in vitro</i> ) .....	156
<b>III.4.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>158</b>
<b>IV.</b>	<b>Impact de la colonisation néonatale du tractus digestif par la souche <i>Lactobacillus Casei</i> BL23 sur la sensibilisation au lait de vache .....</b>	<b>161</b>
<b>IV.1.</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>161</b>
<b>IV.2.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>163</b>
IV.2.1.	Milieux et réactifs .....	163
IV.2.2.	Souris : origine et conditions d'élevage .....	163
IV.2.3.	Observation des caractéristiques physiologiques des souris Ax, Mx et CV ..	164
IV.2.3.1.	Prélèvement d'organes.....	164
IV.2.3.2.	Coupes histologiques d'intestin et marquages immunohistochimiques ...	164
IV.2.4.	Protocole expérimental de sensibilisation .....	165
IV.2.5.	Dosage des anticorps spécifiques dans les échantillons sanguins et fécaux...	166
IV.2.6.	Dosage des cytokines.....	166
IV.2.7.	Analyse des populations lymphocytaires par cytométrie en flux .....	167
IV.2.8.	Analyses statistiques.....	167
<b>IV.3.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>168</b>
IV.3.1.	Caractéristiques physiologiques des souris Ax, Mx et CV .....	168
IV.3.2.	Réponses anticorps induites par la sensibilisation expérimentale .....	169
IV.3.3.	Réponses cellulaires (sécrétion de cytokines après réactivation <i>in vitro</i> ) .....	173
IV.3.4.	Analyse des populations lymphocytaires chez les souris sensibilisées .....	174
<b>IV.4.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>178</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>182</b>
<b>LISTE DES COMMUNICATIONS.....</b>		<b>211</b>

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Description des mécanismes des manifestations cliniques d'hypersensibilité alimentaire .....	16
Figure 2: Définitions des hypersensibilités alimentaires.....	17
Figure 3: Progression des maladies allergiques .....	18
Figure 4: Fréquence des allergies alimentaires à 10 catégories d'aliments chez l'enfant et chez l'adulte .....	20
Figure 5: Le système immunitaire intestinal (GALT : Gut associated lymphoid tissue).....	22
Figure 6: Représentation de la structure tissulaire d'une plaque de Peyer.....	23
Figure 7: Schéma de la présentation d'un peptide exogène par la protéine CMH II.....	24
Figure 8: Induction, régulation et fonctions des cellules Th1/Th2/Th17 et T régulatrices .....	26
Figure 9: Régulation réciproque des cellules Treg et Th17 .....	28
Figure 10: Mécanismes cellulaires de l'allergie aux aliments .....	32
Figure 11: Fréquence relative de 7 tableaux cliniques en fonction de l'âge .....	37
Figure 12: Futures thérapies de l'allergie alimentaire.....	38
Figure 13: Incidence de l'allergie alimentaire selon le sexe et l'âge .....	46
Figure 14 : Facteurs environnementaux impliqués dans la programmation du système immunitaire .....	47
Figure 15: Evolution de l'incidence des infections et des maladies autoimmunes et allergiques dans les pays industrialisés durant les quatre dernières décennies .....	50
Figure 16: Les différents écosystèmes bactériens (microbiotes) associés à l'être humain .....	51
Figure 17: Représentation de la structure du gène codant l'ARN ribosomal 16S bactérien....	53
Figure 18: Le microbiote associé au tractus gastro-intestinal humain .....	57
Figure 19: Les fonctions du microbiote intestinal.....	65
Figure 20: Les cellules de l'épithélium intestinal .....	67
Figure 21: Modèle de l'activation des voies de signalisations des récepteurs Nod1 et Nod2 .....	70

Figure 22: Schéma des TLRs et leurs ligands .....	71
Figure 23: Représentation des voies de signalisation associées aux récepteurs Toll Like .....	72
Figure 24: Protocole expérimental .....	145
Figure 25: Composition du microbiote fécal évaluée à l'aide de 12 sondes spécifiques.....	151
Figure 26: Taux individuels de bactéries ciblées par les sondes Clep1156, Lab158, Ecy11387 et MIB661 .....	152
Figure 27: Réponses anticorps spécifiques de la BLG (sérum) .....	153
Figure 28: Réponses anticorps spécifiques de l' $\alpha$ -lactalbumine (sérum).....	153
Figure 29: Réponses anticorps spécifiques des caséines (sérum) .....	154
Figure 30: Evolution de la température corporelle des souris CVd et CV (A) et induction de mMCP-1 (B) suite au challenge oral .....	156
Figure 31: Sécrétion de cytokines après réactivation des cellules issues des rates (A) et des MLN (B) par la BLG et la CAS .....	157
Figure 32: Protocole expérimental .....	165
Figure 33: Exemple de caecums prélevés chez des souris Ax, Mx et CV .....	168
Figure 34: Marquage immunohistochimique sur des coupes congelées d'intestin.....	169
Figure 35: Réponses anticorps spécifiques de la BLG (sérum) .....	170
Figure 36: Réponses anticorps spécifiques de l' $\alpha$ -lactalbumine (sérum).....	170
Figure 37: Réponses anticorps spécifiques de la CAS (sérum) .....	171
Figure 38: Réponses anticorps spécifiques des caséines (sérum) .....	172
Figure 39: IgA sécrétoires spécifiques mesurées dans les échantillons fécaux .....	172
Figure 40: Sécrétion de cytokines après réactivation des cellules issues des rates (A) et des MLN (B) par la BLG et la CAS .....	173
Figure 41: Pourcentage de cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17).....	174

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Epidémiologie de l'allergie alimentaire chez l'enfant et chez l'adulte .....	19
Tableau 2. Signes cliniques de l'allergie alimentaire.....	36
Tableau 3. Principales caractéristiques des protéines et des allergènes (Bos d 4 à 8) du lait de vache .....	42
Tableau 4: Définitions des séquences et des cibles des sondes utilisées pour la FISH.....	148
Tableau 5: Désignation des bactéries détectées à l'aide des sondes spécifiques .....	152

# INTRODUCTION GENERALE

---

L'allergie alimentaire est une pathologie qui affecte des individus génétiquement prédisposés qui développent une réponse immunitaire inappropriée contre certaines protéines alimentaires. Les causes du développement de cette pathologie sont multifactorielles.

La colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à la naissance participe aux processus de maturation du système immunitaire de l'hôte. Cette influence suggère que l'établissement du microbiote intestinal peut jouer un rôle important dans le développement de maladies allergiques.

Mon sujet de thèse s'intègre dans cette problématique et porte sur l'étude de l'influence de la présence et de la composition du microbiote intestinal sur le développement et la prévention d'une sensibilisation allergique à un antigène alimentaire. Mes travaux de recherche ont été réalisés à l'aide d'un modèle de souris BALB/c gnotoxéniques, hébergées dans des isolateurs afin d'être protégées d'une colonisation par des bactéries de l'environnement. La sensibilisation expérimentale est réalisée à l'aide d'administrations par voie intra-péritonéale ou orale d'un aliment (lait de vache) ou d'un allergène alimentaire purifié (protéines du lait de vache), en absence ou en présence d'un adjuvant. L'évaluation de la réponse immunitaire induite par la sensibilisation expérimentale est ensuite réalisée à partir de plusieurs paramètres dont l'analyse des réponses humorales et des réponses cellulaires après réactivation *in vitro* des cellules provenant de rates ou de ganglions mésentériques. Ces travaux ont été réalisés dans l'Unité INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire (UIAA), établie au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (CEA de Saclay), en collaboration avec l'unité MICALIS et l'équipe ANAXEM de l'INRA de Jouy en Josas et ils ont été financés par l'UIAA et le département Alimentation Humaine.

La première partie de cette introduction générale définit l'allergie alimentaire. La notion de microbiote intestinal est caractérisée dans la deuxième partie. La troisième partie s'intéresse aux relations entre le microbiote intestinal et les pathologies allergiques en particulier. Enfin, la dernière partie de cette introduction générale cible les objectifs des travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse.

# I. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

---

Les aliments permettent de fournir des matières premières et de l'énergie indispensables à l'organisme et ne constituent pas en eux même un danger pour l'organisme. Chez le sujet sain, les aliments induisent naturellement une tolérance immunitaire, cependant, chez certains sujets génétiquement prédisposés, une réaction immunitaire spécifique et inappropriée s'initie contre certaines protéines alimentaires, les transformant ainsi en allergènes alimentaires appelés trophallergènes. Cette réponse engendre une cascade de réactions inflammatoires à l'origine de la symptomatologie clinique de l'allergie alimentaire.

## I.1. HISTORIQUE

Dès le Vème siècle avant JC, Hippocrate avait observé que le lait de vache pouvait provoquer des troubles digestifs et de l'urticaire. Cependant, les notions de base de l'allergie n'ont été définies qu'au XX<sup>ème</sup> siècle.

L'article de Renauld (**Renauld 2002**) propose un historique détaillé de la caractérisation de l'allergie. La réaction anaphylactique fut décrite en 1902 par Richet et Portier, grâce à une étude réalisée sur un modèle canin dans le but d'analyser les effets d'un poison provenant d'anémones de mer. Ils constatèrent que certains animaux ayant reçu une faible dose de ce poison, réagissaient de façon grave après une deuxième injection. Cet effet étant à l'opposé des effets observés pour une « prophylaxie », ils l'appelèrent « anaphylaxie », du grec *ana* (en sens contraire) et *phulaxis* (protection).

C'est un pédiatre autrichien, Clemens Von Pirquet qui utilisa pour la première fois en 1906 le mot allergie, pour décrire une réaction étrange, sans relation avec les symptômes de la maladie lorsqu'il traita des patients souffrant de diphtérie avec du sérum équin antidiphtérique. Le terme « allergie » dérivé du grec ancien, *allos* (autre) et *ergon* (travail, activité) correspond à « une autre façon de répondre » à un stimulus externe. Clemens Von Pirquet et Béla Schick, un pédiatre américain d'origine hongroise, ont été les premiers à définir le mot «allergie» en tant qu'entité clinique désignant toute modification d'ordre immunologique observée lors d'un second contact avec un même antigène.

Au cours d'une expérience réalisée en 1921, Carl Prausnitz s'injecta dans le derme du sérum de Heinz Küstner qui était allergique au poisson. Le lendemain, l'inoculation d'un

extrait de poisson à l'endroit de la première injection provoqua immédiatement une réaction correspondant à de l'urticaire. Cette expérience a abouti à la mise en évidence de la présence dans le sérum d'un patient allergique d'un agent nommé « réagine » capable d'entraîner une réaction cutanée (**Renauld 2002**).

Le terme « maladie atopique » a été proposé dans les années vingt également, par Coca et Cooke afin de caractériser les manifestations cliniques incluant l'asthme, l'eczéma, le rhume des foins et l'urticaire. Gell et Coombs ont établi une classification des hypersensibilités en 1963 pour différencier les modes de réponses excessives de l'organisme. Cette classification regroupe quatre catégories de réaction en fonction de la vitesse d'apparition de la réaction et du mécanisme immunologique responsable des manifestations cliniques (**Gell and Coombs 1963**).

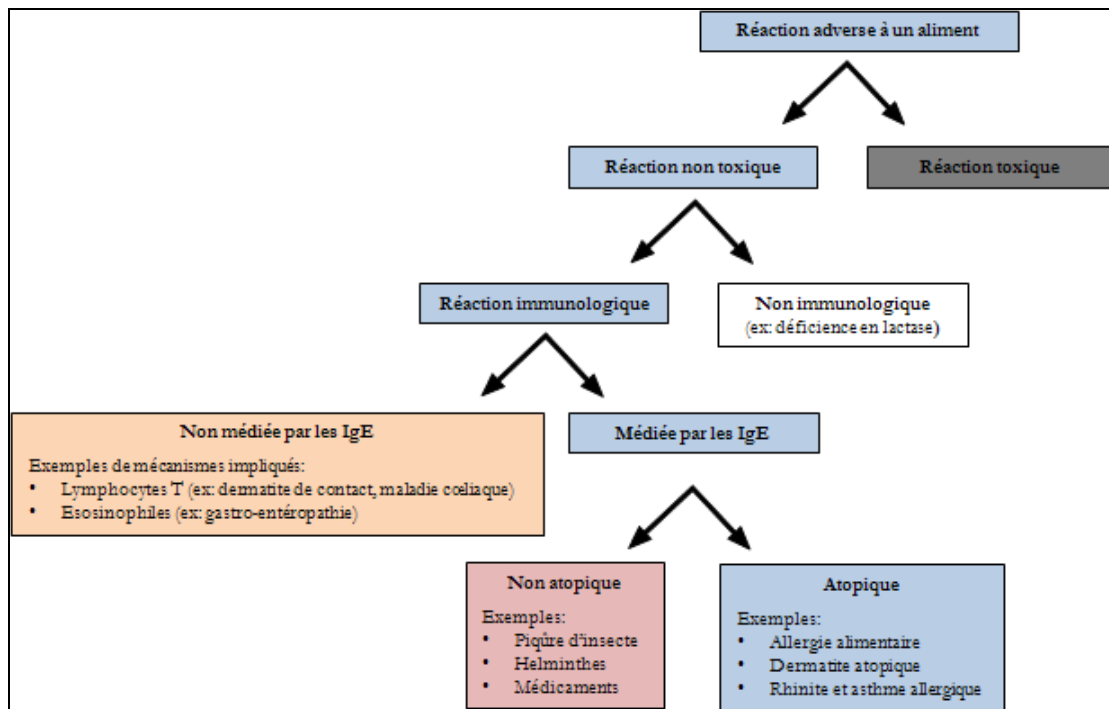
Les réagines n'ont été identifiées en tant qu'Immunoglobulines de type E (IgE) qu'à la fin des années soixante par l'équipe d'Ishizaka (**Ishizaka, Ishizaka and Hornbrook 1966**) ainsi que celle de Johansson et Bennich (**Johansson and Bennich 1967**).

L'ensemble de ces découvertes ont permis de distinguer de façon plus précise les processus impliqués dans les réactions adverses aux aliments, permettant ainsi une meilleure prise en charge des pathologies associées à l'ingestion d'aliments.

## **I.2. DEFINITIONS ET CLASSIFICATIONS**

L'allergie alimentaire dite « vraie » par opposition à celles dites « fausses » implique le développement d'un mécanisme immuno-allergique en réponse à l'ingestion d'un allergène alimentaire. Les allergies « fausses » sont aussi appelées « intolérances alimentaires » et ne nécessitent pas d'intervention du système immunitaire même si les manifestations cliniques qu'elles déclenchent peuvent être similaires à celles retrouvées en cas de « vraie » réaction allergique.

L'Académie Européenne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique (EAACI) a proposé en 2001, une nomenclature qui définit les réactions adverses aux aliments en fonction des manifestations cliniques et des mécanismes impliqués (**Figure 1**). Selon cette nomenclature, les réactions toxiques liées à des contaminants bactériens par exemple (intoxications alimentaires) doivent être distinguées des réactions non toxiques qui peuvent impliquer un mécanisme immunologique ou non (**Johansson et al. 2001**).



**Figure 1: Description des mécanismes des manifestations cliniques d’hypersensibilité alimentaire**  
D’après (Johansson et al. 2001)

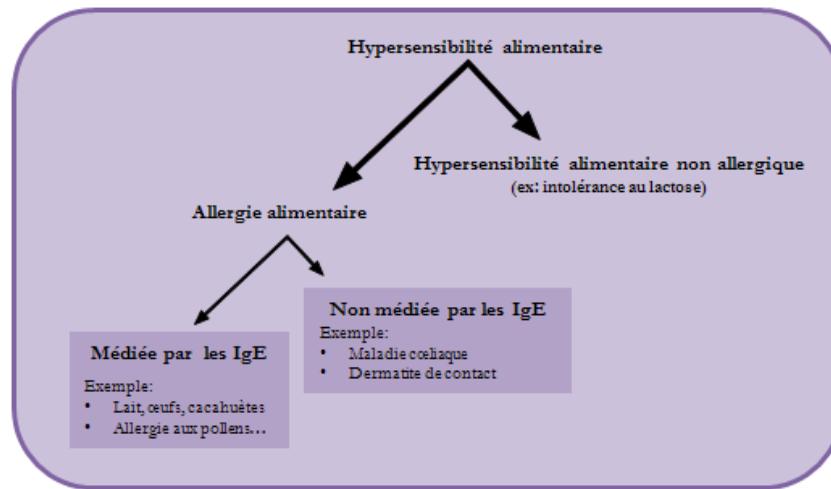
L’EAACI définit l’allergie comme étant une réaction d’hypersensibilité initiée par un mécanisme immunologique dirigé par des immunoglobulines (IgE et IgG) ou des cellules (lymphocytes T). Les allergies impliquant les IgE sont les plus fréquentes et concernent certains asthmes et rhinites, la plupart des allergies alimentaires, les allergies aux venins d’hyménoptères (insectes) et certaines allergies médicamenteuses.

Selon l’EAACI, l’hypersensibilité correspond à l’apparition de symptômes ou de signes reproductibles, provoqués par une stimulation précise et à une dose tolérée par des sujets sains. Le mot atopie caractérise la prédisposition héréditaire qui favorise la sensibilisation par certaines substances inoffensives de l’environnement selon un mécanisme d’hypersensibilité impliquant les IgE. Les sujets atopiques développent des symptômes caractéristiques tels que l’asthme, la rhino-conjonctivite ou l’eczéma.

D’après la nomenclature redéfinie en 2003 par l’Organisation Mondiale de l’Allergie (WAO : *World Allergy Organization*), les réactions indésirables aux aliments (non toxiques) doivent être nommées « hypersensibilités alimentaires ». Le terme « allergie alimentaire » doit être utilisé dans le cas de la mise en évidence du mécanisme immunologique qui peut être associé ou non, à la production d’IgE. Les autres réactions définies précédemment en tant



qu'intolérances alimentaires doivent être nommées « hypersensibilités alimentaires non allergiques » (Johansson et al. 2004) (Figure 2).



**Figure 2: Définitions des hypersensibilités alimentaires**

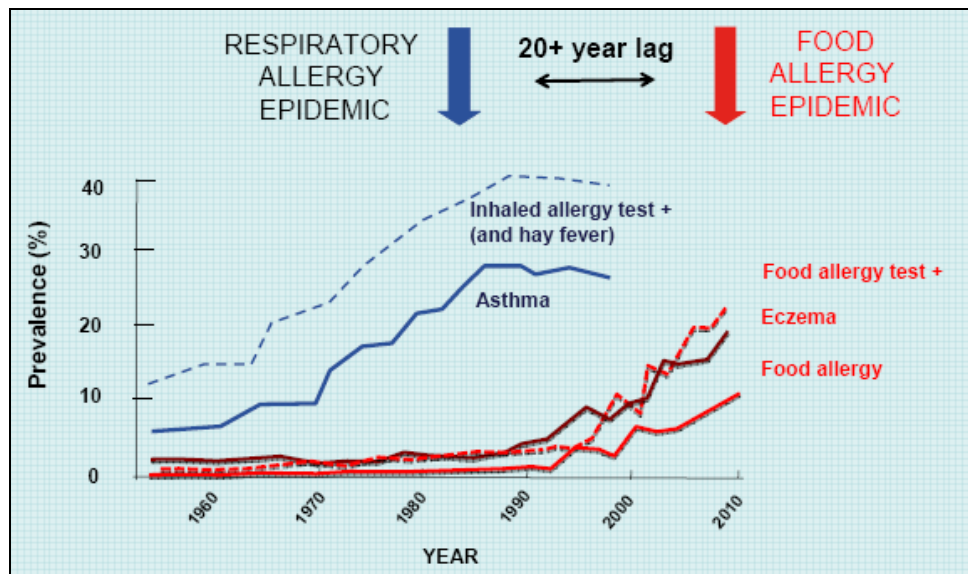
D'après (Johansson et al. 2004)

Mon travail de thèse a été consacré à l'étude de l'allergie alimentaire au lait de vache dont le mécanisme immunologique implique les IgE.

### **I.3. EPIDÉMIOLOGIE ET PREVALENCE**

L'allergie alimentaire est un problème actuel de santé publique. Des études montrent que sa prévalence est en augmentation depuis une vingtaine d'années (Gupta et al. 2007, Liu et al. 2010, Mullins 2007). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'allergie est située au quatrième rang des maladies les plus fréquentes (**International classification of disease (ICD)**). Ce phénomène est décrit par Prescott et Allen comme étant d'autant plus inquiétant qu'il fait suite à l'augmentation de la prévalence d'autres maladies allergiques comme l'asthme et les rhinites allergiques, observée depuis les cinq dernières décennies dans les pays occidentaux (Prescott and Allen 2011). La **Figure 3** présente la progression de maladies allergiques au cours des dernières décennies. En Australie, la fréquence de sensibilisation due aux aéroallergènes est si élevée que plus de la moitié de la population a déjà eu des symptômes associés à une rhinite allergique. L'augmentation des cas d'allergies alimentaires a été observée dans ces mêmes pays. Une étude réalisée aux Etats-Unis indique que durant la période comprise entre 1997 et 2008, la prévalence de l'allergie à l'arachide a

triplé chez les enfants âgés de moins de 18 ans. (Sicherer et al. 2010). Des taux similaires ont été retrouvés au Royaume-Uni et en Australie (Hourihane et al. 2007).



**Figure 3: Progression des maladies allergiques**

Disponible sur : <http://www.worldallergy.org>

L'augmentation des cas d'allergies alimentaires étant relativement récente, des données précises sur la prévalence sont encore limitées et certaines se révèlent être erronées à cause du manque d'études basées sur des techniques de diagnostics performantes comme par exemple les tests de provocation orale (TPO).

D'après une méta-analyse la prévalence de l'allergie est comprise entre 3 et 35% lorsqu'elle est calculée par questionnaire et entre 1 et 10%, lorsqu'elle est diagnostiquée avec un test oral (Rona et al. 2007). En France, la prévalence de l'allergie alimentaire est estimée à environ 3% de la population adulte (Tableau 1). Concernant la population pédiatrique, une étude rapporte que la prévalence dépasse les 10% chez des enfants australiens âgés de 1 an (Sicherer and Leung 2012) faisant de l'Australie, l'un des pays ayant l'un des plus fort taux d'allergie au monde.

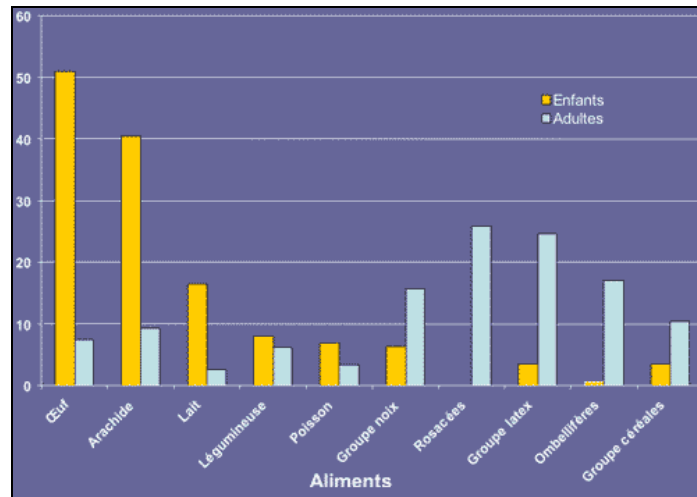
Épidémiologie de l'allergie alimentaire chez l'enfant et chez l'adulte						
Pays	Auteur	Année d'étude	Méthode d'enquête	Taille de population	Population enfants ou adultes	Prévalence (%)
France	Kanny	2001	2 questionnaires à 9 mois d'intervalle	32 000	A + E	3,24
Israël	Dalal	2002	Clinique, PT, IgE	9070	A + E	1,2
Australie	Woods	2002	Clinique PT	1041 5 allergènes	A (20-45 ans)	1,3
Allemagne	Zuberbier	2004	Questionnaire, clinique Sous-groupe : PT, TPO	4093 814	A	3,6 (2,5 AA IgE dépendantes)
États-Unis	Vierk	2007	Questionnaire		A	5,3
Danemark	Osterballe	2005	PT, IgE, TPO	111 < 3 ans 301 > 3 ans	E E	2,3 1
Royaume-Uni	Pereira	2005	Clinique PT, TPO	936 A 775 : cohorte 11 ans 757 : cohorte 15 ans	A E E	3,2 2,3 2,3
France	Rancé	2005	Questionnaire	2716 enfants scolarisés	E 2-5 ans 6-10 ans 11-14 ans	4 6,8 3,4
Royaume-Uni	Venter	2006	PT IgE TPO	798 âgés de 6 ans	E	1,6 TPODA 2,5 (TPO ouv <sup>1</sup> )
Europe	Steinke	2007	Questionnaire	8825	E	4,7
États-Unis	Sicherer	2003	Q standardisé AA arachide	13 493	A + E	1,1
Royaume-Uni	Hourihane	2007	Clinique PT AA arachide	1072 enfants cohorte 4-5 ans	E	1,8

<sup>1</sup>Ouv : ouvert

**Tableau 1: Epidémiologie de l'allergie alimentaire chez l'enfant et chez l'adulte**

Extrait de (Moneret-Vautrin 2008)

Les aliments ayant la capacité de provoquer des réactions allergiques sont très nombreux. Cependant quelques aliments sont à l'origine de la majorité des allergies. En France, les données du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA) (**Figure 4**), indiquent que parmi les aliments les plus fréquemment mis en cause chez l'enfant, on retrouve l'œuf (34% des cas), l'arachide (25% des cas), le lait (8% des cas) et le poisson (5% des cas). Chez l'adulte, les allergènes d'origine végétale et en particulier les rosacées (abricots, cerises, fraises, framboises, noisettes, pêches, poires, pommes, prunes,...) et les fruits dits du groupe latex (bananes, avocats, châtaignes, kiwis,...), sont le plus souvent incriminés. Selon ces données, on pourra distinguer des catégories d'aliments allergisants dont la prévalence augmente (rosacées...) ou diminue (œuf, lait de vache) avec l'âge. L'aliment et l'âge apparaissent donc comme des facteurs de risques associés au développement d'une réaction allergique.



**Figure 4: Fréquence des allergies alimentaires à 10 catégories d'aliments chez l'enfant et chez l'adulte**

Données du CICBAA, février 2005. Disponible sur : <http://www.cicbaa.com>

## **I.4. MECANISME DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE**

Chez la majorité des individus, les protéines alimentaires induisent une tolérance immunitaire. Les mécanismes mis en œuvre permettent ainsi d'éteindre toute réponse immunologique spécifique contre ces protéines, assurant finalement le maintien de l'intégrité de l'organisme (absence de réaction inflammatoire), tout en permettant l'absorption des nutriments nécessaires à sa survie. La rupture ou le manque d'induction de cette tolérance entraîne une sensibilisation pour un ou plusieurs allergènes alimentaires et c'est à ce moment que l'allergie proprement dite se développe chez le sujet atopique.

### **I.4.1. Les acteurs impliqués dans le mécanisme de la réaction allergique**

Le développement d'une allergie alimentaire médiée par les IgE nécessite la coordination de différents acteurs de type cellulaire et moléculaire. Certains de ces acteurs seront définis avant de détailler les mécanismes immunologiques de l'allergie alimentaire.

#### **I.4.1.1. Les immunoglobulines de type E et leurs récepteurs**

Il existe cinq classes d'immunoglobulines ou anticorps (IgD, IgM, IgA, IgG et IgE) produits par les plasmocytes en réponse à une stimulation par un antigène.

Les IgE (Epsilon) sont les marqueurs de la sensibilisation allergique. Elles se distinguent des IgG par la présence d'un domaine constant supplémentaire et font partie des immunoglobulines les moins abondantes. Chez l'adulte normal leur concentration sérique varie de 0,05 à 1µg/ml contre 10mg/ml pour les IgG. Malgré cette faible concentration, les IgE peuvent occuper en permanence une grande proportion de leurs récepteurs grâce à la haute affinité de leur liaison avec ces récepteurs ( $K_D = 10^{-9}$  à  $10^{-10}$ M) (**Kinet 1999**). Les parties C-terminales constantes des chaînes lourdes contiennent le site de liaison aux récepteurs pour les IgE (FcεR).

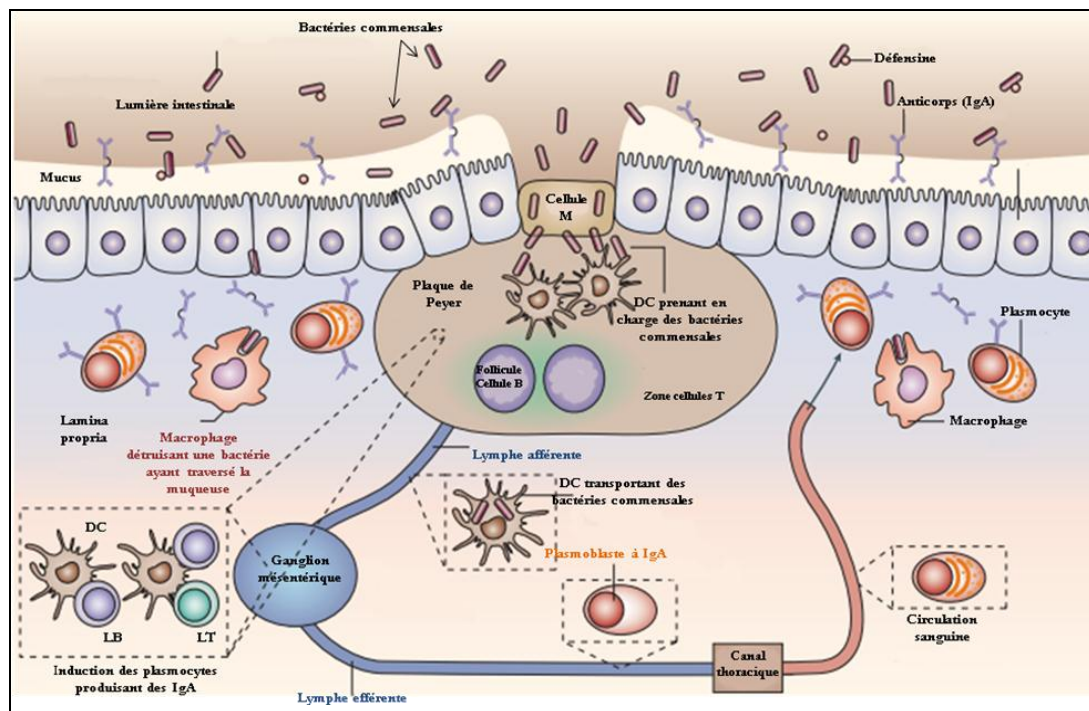
Il existe deux types de récepteurs pour les IgE : le récepteur de haute affinité (FcεRI) et le récepteur de faible affinité (FcεRII ou CD23). Ces récepteurs exprimés à la surface de cellules cibles, assurent la connexion entre les composants humoraux (anticorps) et cellulaires du système immunitaire (**Daéron 1997**). Le FcεRI est un complexe membranaire tétramérique composé d'une chaîne α (site de fixation des IgE), d'une chaîne β et d'un dimère de chaînes γ (**Blank et al. 2003**). Chez la souris le FcεRI n'est exprimé qu'à la surface des mastocytes et des basophiles alors que chez l'homme, il existe aussi une forme trimérique (αγ<sub>2</sub> sans chaîne β) qui est exprimée par les cellules présentatrices de l'antigène (monocyte/macrophage, cellules dendritiques) ainsi que par les éosinophiles et les plaquettes (**Lin et al. 1996**), (**Maurer et al. 1996**). Selon certaines études, la chaîne β, aurait un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de signalisation du FcεRI (**Donnadieu, Jouvin and Kinet 2000**, **Lin et al. 1996**, **Dombrowicz et al. 1998**). Le récepteur FcεRII (ou CD23) est un homotrimère membranaire existant sous deux formes: CD23a et CD23b. La forme CD23a est exprimée par les lymphocytes B et l'autre forme (CD23b) est induite par l'IL-4 sur les lymphocytes T, les cellules de Langerhans, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles (**Yokota et al. 1988**). Ce second récepteur est également capable de lier des IgE mais présente une plus forte affinité pour les complexes immuns IgE-antigène comparée aux IgE libres.

#### **I.4.1.2. Le système immunitaire associé à l'intestin**

Les muqueuses du tractus gastro-intestinal représentent en moyenne, une surface comprise entre 200 et 300 m<sup>2</sup> (**Hao and Lee 2004**), ce qui représente une importante zone de contact entre les cellules de l'organisme et le milieu extérieur notamment les aliments ingérés ainsi que les bactéries de . On considère que l'intestin est le premier organe immunitaire de l'organisme humain car 60 à 70% des cellules immunes sont présentes dans la muqueuse

intestinale. Les sites inducteurs et effecteurs d'une réponse immunitaire spécifique sont composés par les structures lymphoïdes décrites comme étant des tissus ayant différents niveaux d'organisation.

Les plaques de Peyer (PP) et les ganglions mésentériques (MLN : Mesenteric Lymph Nodes) sont des structures organisées en follicules alors que la *lamina propria* est une structure diffuse. Ces différents éléments forment le « Gut-Associated Lymphoid » Tissue (GALT) (**Figure 5**).



**Figure 5: Le système immunitaire intestinal (GALT : Gut associated lymphoid tissue)**

LB et LT : Lymphocytes B et T ; DC : cellules dendritiques

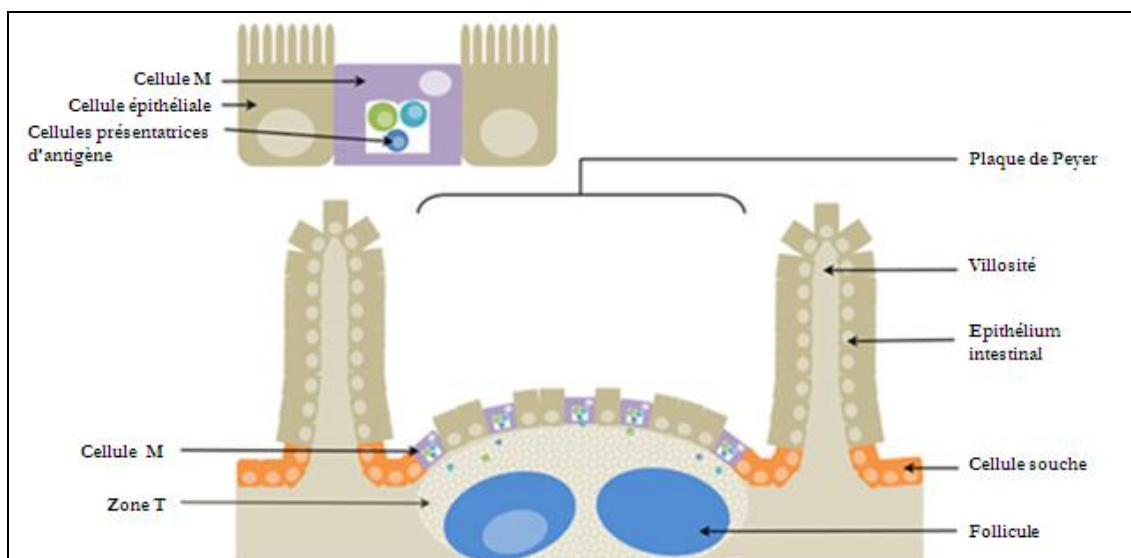
D'après (Macpherson and Harris 2004)

Les PP contiennent de nombreux lymphocytes T et B naïfs apportés par les vaisseaux nommés HEV (High Endothelial Venule). Les ganglions mésentériques centralisent la réponse immunitaire intestinale. Un ganglion est irrigué par une lymphie afférente qui draine les PP et la *lamina propria*. Ce type de lymphie transporte différentes cellules dendritiques qui permettent d'initier la réponse immunitaire et la lymphie efférente assure la mise en circulation des cellules activées (LT et LB) dans le compartiment sanguin. Ces tissus sont composés de différentes cellules immunocompétentes qui participent aux mécanismes de défense contre les pathogènes, tout en permettant une tolérance face aux antigènes alimentaires mais également face à la grande diversité des bactéries du microbiote intestinal. Les réponses immunes

protectrices comprennent entre autre la production des IgA sécrétoires (sIgA). Ces immunoglobulines adaptées à l'intestin, participent à l'inhibition de la translocation bactérienne et de la multiplication virale dans les entérocytes. Elles peuvent également neutraliser les toxines et bloquer l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale.

#### **I.4.1.2.a. Les cellules M (microfold cells ou cellules membraneuses)**

Ces cellules recouvrent les PP (**Figure 6**) qui constituent un site important pour l'initiation de la réponse immunitaire intestinale car elles contiennent de nombreux lymphocytes naïfs.



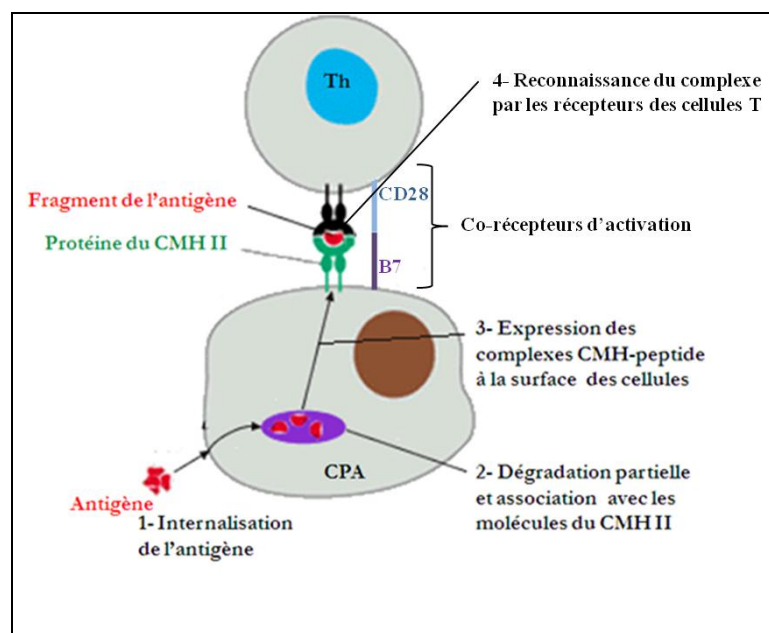
**Figure 6: Représentation de la structure tissulaire d'une plaque de Peyer**

Disponible sur : <http://www.cours-pharmacie.com>

Les cellules M peuvent intercepter des macromolécules présentes dans la lumière intestinale pour les transmettre de façon intacte au niveau du site d'induction de la réponse immune où elles seront prises en charge par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Ce passage par les cellules M représente une étape clef dans l'induction d'une réponse locale et systémique spécifique (**Neutra 1998**). Cependant, il existe des études qui contestent le rôle potentiellement actif de ces cellules dans la capture des antigènes aboutissant au développement d'une hypersensibilité alimentaire (**Untersmayr and Jensen-Jarolim 2006**). De plus, leur capacité de prise en charge de protéines solubles n'a pas réellement été démontrée (**Cehade and Mayer 2005**).

#### **I.4.1.2.b. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)**

Ces différentes cellules constituent un groupe hétérogène. Elles peuvent être des cellules dendritiques, des macrophages activés ou des lymphocytes B activés. Ces cellules sont responsables de la dégradation intracellulaire des antigènes et de leur présentation à la surface cellulaire sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). La formation du complexe CMH-peptide antigénique est un élément clé de la présentation car ce complexe pourra être reconnu de façon spécifique par un lymphocyte T naïf via son récepteur à l'antigène (T Cell Receptor, TCR) déclenchant l'activation de ce lymphocyte (**Figure 7**).



**Figure 7: Schéma de la présentation d'un peptide exogène par la protéine CMH II**

Disponible sur : <http://www.virologie.free.fr>

Les CPA expriment également des molécules de co-stimulation indispensables à l'activation des lymphocytes ainsi que des récepteurs de reconnaissance de motifs antigéniques (pattern recognition receptor, PRR) incluant les récepteurs de type Toll (Toll Like receptor, TLR) et les récepteurs de type NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) (**Untersmayr and Jensen-Jarolim 2006**).

Les cellules dendritiques sont appelées CPA professionnelles car leur principale fonction est la présentation d'antigène. Leurs dendrites ramifiées augmentent la capacité de captation de l'antigène. Ces cellules appartiennent à trois populations différentes selon leur localisation dans l'organisme : les cellules de Langerhans dans la peau et les épithéliums



muqueux, les cellules dendritiques myéloïdes dans les tissus interstitiels et le derme ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans les organes lymphoïdes et le sang.

#### **I.4.1.2.c. Les entérocytes**

Ce type de cellules épithéliales est le plus répandu au niveau de la muqueuse intestinale et est caractérisé par sa fonction d'absorption de nombreux nutriments. Ces cellules possèdent également des activités enzymatiques qui interviennent dans la digestion des glucides et des protéines. Des études indiquent que ces cellules pourraient influencer l'induction de la tolérance ou le développement de l'allergie alimentaire. Ces cellules seraient capables de phagocyter des antigènes alimentaires puis après dégradation cellulaire par voie lysosomiale, de les présenter en association avec des molécules du CMH II, fonctionnant ainsi, comme des CPA (Yu and Perdue 2001). De plus une étude indique que le récepteur de haute affinité pour les IgE est exprimé à la surface de cellules de l'épithélium intestinal humain, plus précisément au niveau du colon et de l'intestin grêle (Untersmayr et al. 2010).

#### **I.4.1.2.d. Les lymphocytes**

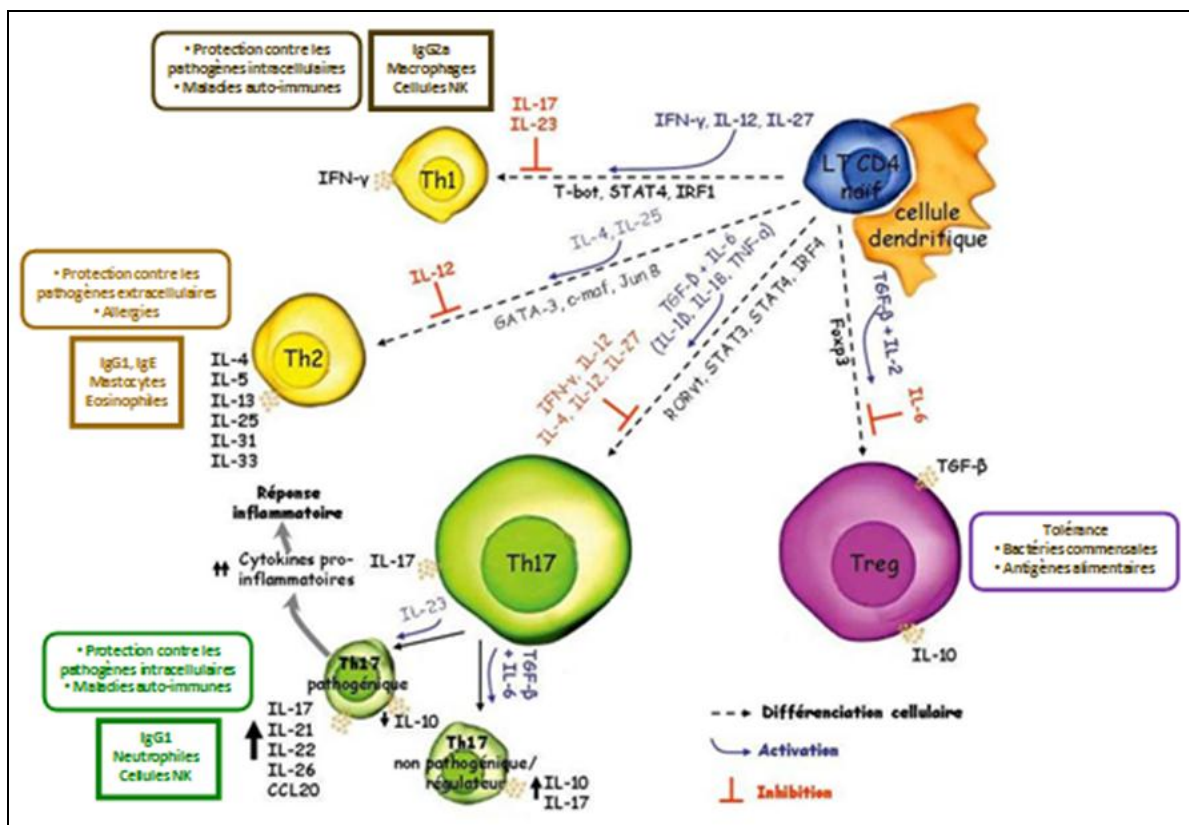
Ces cellules jouent un rôle majeur dans le système immunitaire en agissant selon un mécanisme dépendant du type de lymphocyte. Elles sont produites au niveau de la moelle osseuse mais le lieu de leur maturation diffère en fonction du type de lymphocyte. Elles sont présentes dans le sang, dans la lymphe et dans tous les organes lymphoïdes. Ces cellules se caractérisent par l'expression de marqueurs membranaires de différenciation (Clusters of differentiation (CD)), permettant leur identification. Les lymphocytes T sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire tandis que les lymphocytes B sont responsables de la production d'anticorps (immunité humorale).

##### ***I.4.1.2.d.i. Les lymphocytes T (LT)***

Les lymphocytes T immatures migrent de la moelle osseuse vers le thymus afin d'acquérir l'immunocompétence. Les lymphocytes T périphériques sont caractérisés par la présence de marqueurs membranaires spécifiques comme les récepteurs pour les antigènes (TCR) dont la liaison au complexe CMH II-antigène entraîne l'activation cellulaire. On distingue deux grands groupes de cellules T : les cellules effectrices (LT cytotoxiques ou LT CD8<sup>+</sup>) qui agissent contre l'« agresseur » et les cellules modératrices (LT auxiliaires, Th pour T helper ou LT CD4<sup>+</sup>) qui contrôlent le fonctionnement des cellules effectrices. Les LT CD4<sup>+</sup> activés sont des piliers de la mise en place de la réponse spécifique car ils peuvent réguler

l'activation, la prolifération et la différenciation d'autres cellules immunes qui agiront de manière plus directe. Il existe différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> qui dérivent toutes d'un même précurseur, le LT naïf (Th0).

Ces différences sont établies en fonction de la nature des cytokines sécrétées et du type de réponses induites (**Figure 8**). Les cytokines sont des glycoprotéines spécialisées dans la communication intercellulaire, produites en réponse à une activation cellulaire. On distingue plusieurs familles de cytokines (interleukines (IL), interféron (IFN)...) qui exercent leur action en se fixant sur des récepteurs présents sur des cellules cibles.



**Figure 8: Induction, régulation et fonctions des cellules Th1/Th2/Th17 et T régulatrices**

D'après ebioscience. Disponible sur <http://www.ebioscience.com>

La différenciation des LTh0 en LTh1 est induite en présence d'IL-12 *via* l'activation de STAT-4 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), pour lutter contre les pathogènes intracellulaires (bactéries ou virus). Le facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) joue un rôle important dans le développement et le maintien des LTh1, caractérisés par la production d'IFN- $\gamma$  (**Murphy and Reiner 2002**). Ces cellules favorisent l'immunité à médiation cellulaire.

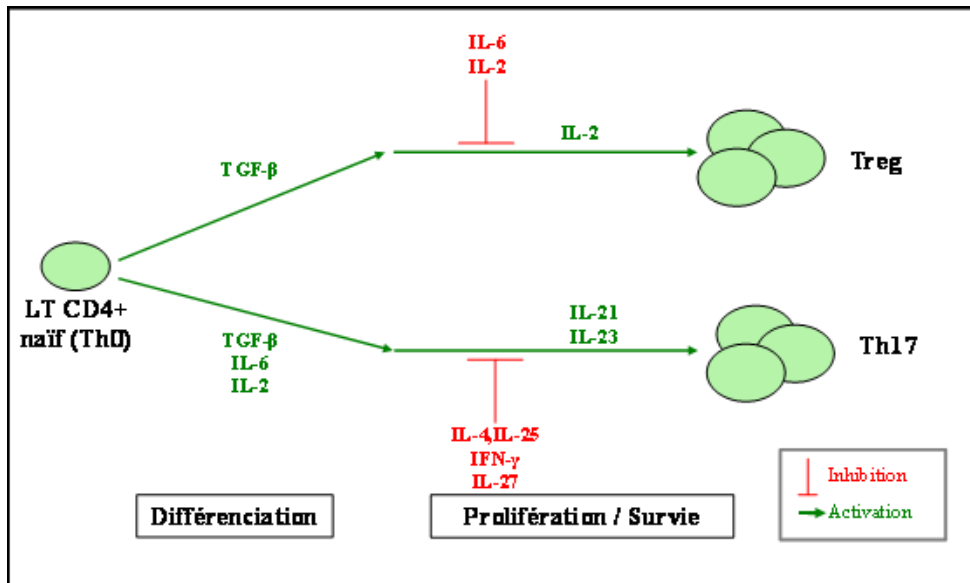
Les LTh2 sont induits en présence d'IL-4 *via* l'activation de STAT-6. Ils sont impliqués dans les processus d'élimination de pathogènes extracellulaires, dont certains

parasites comme les Helminthes. Ils sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 qui favorisent l'immunité à médiation humorale (**Romagnani 1994, Akdis, Blaser and Akdis 2004a**). L'activation du facteur de transcription GATA-3 induit le développement d'une réponse de type Th2 (**Zhu et al. 2006**).

Les LTh17 ont été identifiés en 2005 (**Harrington et al. 2005, Langrish et al. 2005, Park et al. 2005**). Les données d'une revue récente indiquent que chez l'homme, les cytokines qui induisent la différenciation vers le profil Th17, sont l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et l'IL-1 $\beta$ . Le TGF- $\beta$  aurait un rôle potentiellement synergique du fait de sa capacité à stopper la différenciation vers le profil Th1 (**Marwaha et al. 2012**). Les LTh17 produisent principalement de l'IL-17 mais aussi d'autres cytokines comme l'IL-21 et l'IL-22. Ils peuvent intervenir en cas d'infection et sont également impliqués dans l'autoimmunité et l'immunodéficiência. Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t (Retinoïd-related Orphan nuclear Receptor) contrôle la différenciation de ces cellules (**Ivanov, Zhou and Littman 2007**).

Les lymphocytes T régulateurs sont chargés de maintenir l'homéostasie de l'organisme en agissant sur les réponses immunitaires induites. Il s'agit de plusieurs types de cellules exprimant toutes le CD4 : les cellules Th3, Tr1 et Treg. Les LTh3 sont notamment induits suite à l'administration orale d'antigène et exercent leur activité suppressive via la production de TGF- $\beta$  (**Weiner 2001, Ozdemir, Akdis and Akdis 2009**). Les LTr1 sont induites en présence d'IL-10 et exercent leur activité suppressive non spécifique, indépendamment du CMH via la production d'IL-10 (**Wu et al. 2007**). Les LTreg expriment le récepteur de l'IL-2 (CD25+) à leur membrane et le facteur intracellulaire de transcription *Forkhead box p3* (Foxp3) (**Romagnani 2006**). Ce facteur de transcription semble jouer un rôle majeur dans le développement et la fonctionnalité des Treg (**Ozdemir et al. 2009**). Ces LTreg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) se différencient sous l'effet du TGF- $\beta$  et de l'IL-2 et agissent par contact direct avec d'autres cellules via le TGF- $\beta$  lié à leurs membranes (**Nakamura, Kitani and Strober 2001**). Elles expriment des molécules CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) et GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor) qui sont impliquées dans l'action immunosuppressive des Treg.

Il existe une relation entre les LTreg et les LTh17 (**Figure 9**). Le TGF- $\beta$  peut induire l'expression des facteurs de transcriptions Foxp3 et ROR $\gamma$ t, mais en présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-2, la différenciation sera orientée vers le profil Th17 (**Ivanov et al. 2007**).



**Figure 9: Régulation réciproque des cellules Treg et Th17**

#### ***1.4.1.2.d.ii. Les lymphocytes B***

Les lymphocytes B terminent leur développement dans la moelle osseuse. Les cellules matures expriment un récepteur membranaire spécifique (BCR pour « B cell receptor ») qui peut reconnaître directement les antigènes natifs, en solution ou à la surface des CPA. Cette reconnaissance conduisant à l'activation du lymphocyte B est le support de la spécificité de la réponse humorale. L'activation du lymphocyte B va aboutir à sa différenciation en plasmocyte, capable de produire des anticorps spécifiques de l'antigène. Cette différenciation est régulée par le profil des cytokines produites par les lymphocytes T. Dans le cas d'une réaction suite à l'ingestion d'une protéine alimentaire, l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules Th1, favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgG2a chez la souris. Les cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5 induisent la prolifération des lymphocytes B et favorisent une commutation de classe du lymphocyte B vers la production d'IgE et d'IgG1 (Ngoc et al. 2005). La production d'IgA par les lymphocytes B peut être stimulée par les cellules régulatrices via la sécrétion de TGF- $\beta$  (Spellberg and Edwards 2001, Cerutti and Rescigno 2008).

#### **1.4.1.2.e. Les cellules effectrices**

##### ***1.4.1.2.e.i. Les mastocytes***

Il existe deux types de mastocytes en fonction de leur localisation et de leurs propriétés. Ces cellules sont situées au niveau des tissus muqueux ou conjonctifs à proximité

des vaisseaux sanguins. Elles sont des acteurs majeurs de la réaction allergique car elles sont caractérisées par leur forte capacité d'expression de la forme tétramérique du FcεRI. Leur cytoplasme contient de nombreuses granules renfermant des médiateurs chimiques. Parmi les médiateurs chimiques préformés on retrouve notamment l'histamine, des enzymes (tryptase, carboxypeptidase A...) ainsi que des protéoglycanes comme l'héparine et les sulfates de chondroïtine. Les médiateurs néoformés comprennent la prostaglandine D2 (PGD2), les leucotriènes et les facteurs activant les plaquettes (Platelet Activating Factor (PAF)) **(Greenberger and Ditto 2012)**. L'activation de ces cellules *via* les récepteurs aux IgE déclenche la libération du contenu des granules dans le milieu extracellulaire et la synthèse des médiateurs néoformés. Ces cellules peuvent également produire des chimiokines et des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13 qui vont entretenir la réponse Th2. Elles sont aussi impliquées dans les réactions anaphylactiques observées au cours des réactions allergiques non médiées par les IgE. Dans ce cas, la libération du contenu des granules est indépendante de la présence d'IgE spécifiques, on peut citer l'exemple des produits radiographiques de contraste dont certains sont capables d'activer le FcεRI. D'autres conditions non-immunologiques peuvent être à l'origine de la libération des médiateurs chimiques comme l'exercice physique, l'exposition à de faibles températures ou à des médicaments **(Greenberger and Ditto 2012)**.

#### ***1.4.1.2.e.ii. Les basophiles***

Les basophiles sont des cellules circulantes (localisation principalement sanguine) se différenciant sous l'influence de l'IL-3 **(Arock 2004)**. Leurs inclusions cytoplasmiques contiennent de nombreuses molécules chimiques, et en particulier l'histamine, la sérotonine et l'héparine. Ils expriment fortement le FcεRI (30000 FcεRI / cellule) **(Malveaux et al. 1978)**. Des études indiquent que leur nombre est corrélé avec la sévérité des maladies allergiques **(Knol et al. 1996)**.

#### ***1.4.1.2.e.iii. Les éosinophiles***

Ces cellules jouent un rôle important dans l'inflammation allergique. Leur localisation est surtout tissulaire. L'IL-5 et l'éotaxine stimulent la différenciation et la migration de la lignée éosinophile. Ces cellules renferment des substances participant à l'amplification de la réponse allergique. Des médiateurs de l'inflammation peuvent en effet être libérés suite à leur activation par la fixation de complexes IgE-allergène sur les récepteurs de faible affinité

(FcεRII). Elles peuvent également produire des cytokines capables d'accentuer les réponses de type Th2 au niveau local.

#### **I.4.1.3. Le système immunitaire inné associé à l'intestin**

Les défenses mises en place au niveau de l'intestin comprennent l'activité de cellules appartenant à l'immunité innée. L'immunité innée est une première ligne de défense qui contrôle l'agent indésirable et contribue à son élimination avant le développement de l'immunité adaptative spécifique (LT et LB).

Ce composant immunitaire regroupe les mécanismes cellulaires (cellules épithéliales, cellules Natural Killer (NK), polynucléaires, cellules dendritiques) et humoraux (complément, peptides antimicrobiens, protéine C réactive, lectine) non spécifiques de l'antigène (**Turvey and Broide 2010, Schroder 2009, Metz and Maurer 2009**).

L'immunité innée est mise en jeu *via* l'identification de la nature et du risque de l'agression à l'aide de récepteurs spécifiques. Ce composant immunitaire peut neutraliser les microorganismes grâce à la phagocytose, l'action de molécules comme les peptides antimicrobiens et le complexe de lyse du complément ou par la production de facteurs antiviraux. La réponse innée permet l'induction de la réponse adaptative spécifique de l'antigène adéquate pour protéger l'hôte. Elle participe à l'orientation de la réponse adaptative notamment selon le degré de maturation des CPA (**Pichavant et al. 2003**).

Les acteurs de la réponse innée tels que les cellules dendritiques et les macrophages sont activés par des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de microorganismes (PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern) *via* leurs récepteurs de reconnaissance de motifs antigéniques PRR (Toll-like receptors, NOD-like receptors). Dès 1989, Janeway a évoqué l'existence de PRR reconnaissant ces PAMPs et activant la réponse immunitaire (**Janeway 1989**). Ces PRR peuvent également réagir aux signaux des bactéries du microbiote intestinal permettant ainsi une étroite relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire de l'hôte (**Cf paragraphe II-6-3**).

L'immunité innée comprend également l'effet de barrière dû aux cellules de l'épithélium intestinal ainsi que les lymphocytes T Natural killer et les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . D'autres cellules de l'immunité innée semblent jouer un rôle important dans l'orientation de la réponse immunitaire. Les nuocytes par exemple, sont des leucocytes effecteurs récemment identifiés comme étant impliqués dans le développement de réponses cytokiniques de type Th2 (**Neill et al. 2010, Saenz et al. 2010**).

## **I.4.2. Description du mécanisme de l'allergie alimentaire**

Le mécanisme fondamental de la réaction allergique immédiate dépendante des IgE, s'effectue en deux phases : la sensibilisation et le déclenchement.

### **I.4.2.1. Exposition à l'allergène**

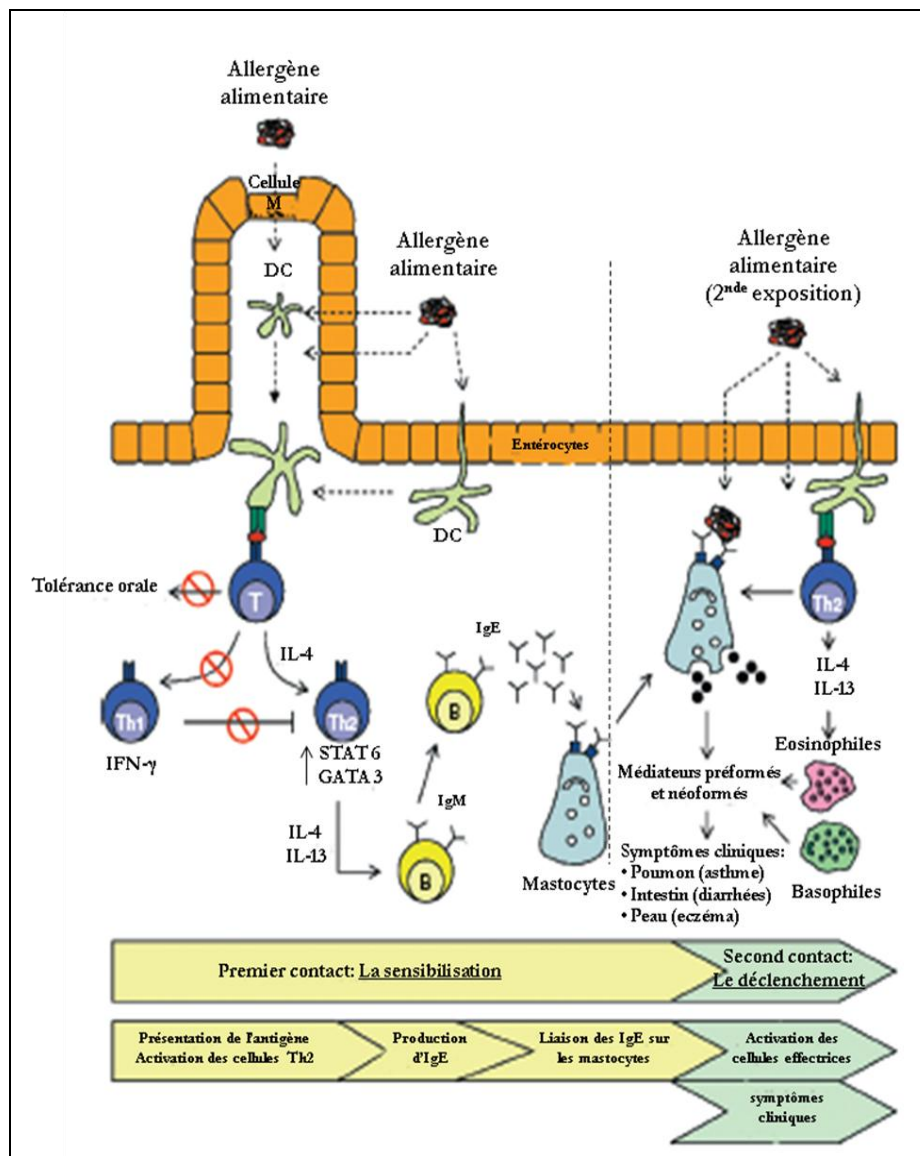
Il existe différentes voies de sensibilisation à des allergènes alimentaires. Dans le cas des allergies alimentaires dites de classe 1, la sensibilisation se produit au niveau du tractus gastro-intestinal (**Han, Kim and Ahn 2012**). Les aliments concernés (lait de vache, œuf...) se caractérisent entre autres par leur résistance aux processus digestifs. Ce type d'allergie alimentaire affecte particulièrement les enfants. La voie respiratoire est impliquée dans le développement des allergies alimentaires de classe 2. Ce type d'allergie alimentaire est responsable du Syndrome Oral Croisé (SOC ou OAS : *Oral Allergy Syndrom*) retrouvé majoritairement chez des adultes sensibilisés à des aliments (carotte, céleri, pomme poire...) dont les protéines présentent des similitudes avec celles d'aéro-allergènes notamment l'allergène majeur du pollen de bouleau (Bet V1 : *Betula verrucosa* 1) (**Breiteneder and Ebner 2000**). La sensibilisation par voie cutanée a également été suggérée. Selon les données publiées par Lack en 2008, de façon générale l'exposition cutanée conduirait au développement de l'allergie alimentaire tandis que l'exposition orale induirait le plus souvent la tolérance à l'allergène (**Lack 2008**). Cette voie a été mise en évidence dans des études effectuées à partir de modèles animaux (**Adel-Patient et al. 2007, Strid et al. 2005**).

Ces différentes voies de sensibilisation mènent toutes au développement de l'allergie alimentaire qui par définition se déclenche suite à une consommation d'aliments.

### **I.4.2.2. Première étape : la phase de sensibilisation**

Lors de la sensibilisation allergique, les CPA du GALT captent l'antigène alimentaire, et après la lyse intracellulaire, associent les peptides dérivés de l'antigène aux molécules du CMH II à leur surface. Les CPA ainsi activées migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques « locaux » (PP ou MLN), où elles interagissent avec les cellules T CD4+ naïves. Cette interaction cellulaire va induire la différenciation des cellules naïves en cellules Th2, sécrétant des cytokines dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Ces cytokines vont notamment induire la transformation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques. Les IgE spécifiques de l'allergène se répartissent ensuite dans l'ensemble de

l'organisme, via la circulation sanguine, et se fixent sur des « cellules cibles » de la peau et des muqueuses (mastocytes) ainsi que sur des « cellules cibles » circulantes (basophiles) exprimant le récepteur pour la partie constante des IgE. Cette première étape, appelée phase de sensibilisation, muette cliniquement, prépare l'organisme à réagir de façon immédiate lors d'un second contact avec l'allergène (**Figure 10**).



**Figure 10: Mécanismes cellulaires de l'allergie aux aliments**

D'après (Prioult and Nagler-Anderson 2005)

### **I.4.2.3. Deuxième étape : la phase de déclenchement**

Lors du second contact entre l'allergène et l'organisme, celui-ci est reconnu par les IgE spécifiques liées aux cellules effectrices via leurs récepteurs. Le pontage des IgE va entraîner l'agrégation du FcεRI qui va induire la phosphorylation des résidus tyrosines



présents dans les motifs ITAM du récepteur. Cela va permettre le recrutement d'autres effecteurs et la mise en place de multiples cascades de signalisation aboutissant finalement à la libération rapide du contenu des granules (dégranulation). D'autres médiateurs de type lipidique et des cytokines pro-inflammatoires sont également produits. Ils participent à l'amplification de la réaction inflammatoire et au recrutement de cellules telles que les éosinophiles et les lymphocytes T au niveau du lieu du déclenchement. Lors du déclenchement de la réaction allergique, on distingue deux phases.

La phase précoce est très rapide et est principalement due aux effets immédiats de l'histamine libérée qui agit au niveau des récepteurs H1 des vaisseaux et des bronches. Les effets regroupent la dilatation des petits vaisseaux sanguins, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la stimulation de la contraction transitoire des muscles lisses. Ces effets peuvent être traduits par l'observation d'une hypothermie.

La phase tardive se met en place dans les deux à huit heures suivant la dégranulation, et persiste pendant au moins un à deux jours. Elle correspond à une réponse inflammatoire déclenchée par les médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-4, l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-16 ou encore CCL3 (**Lorentz et al. 2000**). Les symptômes cliniques apparaissent au cours de la phase de déclenchement.

### **I.4.3. Régulation du mécanisme**

Les IgE et leurs récepteurs ainsi que certaines cellules du système immunitaire intestinal participent activement à la modulation du développement de la réponse allergique.

L'expression du Fc $\epsilon$ RI à la surface des mastocytes, des basophiles, des monocytes, des éosinophiles et des cellules dendritiques est plus importante chez des sujets atopiques que chez des sujets normaux (**Malveaux et al. 1978**). Des études indiquent que les IgE peuvent réguler positivement le Fc $\epsilon$ RI à la surface des mastocytes, basophiles, monocytes et cellules dendritiques (**Yamaguchi et al. 1997, Lantz et al. 1997, MacGlashan et al. 1997**). La liaison IgE-récepteurs empêche la dégradation des récepteurs exprimés à la surface tout en maintenant la synthèse basale. Cette stabilisation des récepteurs résulte en une accumulation progressive des récepteurs à la surface de la cellule. Ce haut niveau d'expression entraîne une augmentation de la capacité des mastocytes à fixer un plus grand nombre d'IgE et donc à libérer plus de médiateurs de l'allergie. Chez l'homme, l'IL-4, peut induire l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI par les mastocytes et les CPA (**Toru et al. 1996, Novak et al. 2003**).

Mais inversement, l'IL-10 diminue l'expression de ce récepteur et ainsi diminue les symptômes de l'allergie (**Kennedy Norton et al. 2008**).

D'autre part, il existe une régulation réciproque négative entre les LTh1 et les LTh2. L'IFN- $\gamma$  inhibe la prolifération des cellules Th2, à l'inverse, l'IL-4 et l'IL-10 produites par les lymphocytes Th2 inhibent la synthèse des cytokines par les cellules Th1. (**Romagnani 2004**).

Dans le cas de l'allergie alimentaire, plusieurs types cellulaires régulent l'orientation vers la tolérance orale ou l'hypersensibilité (**Tsuji and Kosaka 2008**). Les cellules aux propriétés régulatrices regroupent les cellules Th3 productrices de TGF- $\beta$ , les cellules Tr1 productrices d'IL-10, les cellules Treg (FoxP3<sup>+</sup>), et les cellules T Natural Killer (NKT) (**van Wijk et al. 2007, Akbari and Umetsu 2004, O'Garra and Vieira 2004**). Les Treg agissent sur les deux phases de la réaction allergique. Elles diminuent la capacité des cellules dendritiques à recruter les cellules Th1, Th2, ou Th17, tout en favorisant le développement de cellules dendritiques ayant un phénotype tolérogénique (**Wing et al. 2008**). Elles sont également capables d'inhiber l'activation des cellules Th2 spécifiques de l'allergène, limitant ainsi la production de cytokines de type Th2 impliquées dans la réaction allergique (**Akdis et al. 2004b**) ainsi que la production d'IgE spécifiques de l'allergène (**Meiler et al. 2008**). De plus ces cellules peuvent altérer la dégranulation des mastocytes grâce à la production d'IL-10 et TGF- $\beta$  et par contact cellule-cellule (**Gri et al. 2008, Bundoc and Keane-Myers 2007**). Elles ont aussi été décrites comme pouvant diminuer l'expression du récepteur Fc aux IgE sur les mastocytes ce qui réduit leur capacité à dégranuler et à induire des réponses cutanées (**Kashyap et al. 2008**).

Les lymphocytes T Natural killer (NKT) forment une population hétérogène de lymphocyte T, portant le marqueur NK1.1 (ou CD161). Il existe plusieurs sous-types avec des caractéristiques fonctionnelles distinctes. Parmi ces différents sous-types, les cellules NKT invariantes (iNKT) sont les plus nombreuses et les mieux décrites chez l'homme et chez la souris. Les cellules iNKT peuvent reconnaître des glycolipides et sécréter une fois activées, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4 ou IL-13 (**Cohen, Garg and Brenner 2009, Kronenberg 2005**). Elles sont impliquées dans la sévérité de l'asthme allergique expérimentale (**Akbari et al. 2003**). En effet, les résultats d'une étude montrent que ces cellules sont nécessaires à l'inflammation pulmonaire et à l'hyperréactivité bronchopulmonaire dans un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine chez la souris (**Lisbonne et al. 2003**).

Une autre étude montre qu'un traitement avec un glycolipide, l' $\alpha$ -Galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) qui agit spécifiquement sur ces cellules peut modifier l'orientation du profil de

cytokines sécrétées vers un profil pro-Th1 (producteur d'IFN-g) et donc diminuer les symptômes de l'asthme (**Hachem et al. 2005**). Chez l'homme, des résultats ont montrés que le taux de cellules iNKT était augmenté dans les poumons des enfants adultes et asthmatiques (**Pham-Thi et al. 2006, Akbari et al. 2006, Sen et al. 2005**). Une étude réalisée chez la souris a cependant observé que la diminution des lymphocytes iNKT est associée à l'augmentation des symptômes de l'allergie expérimentale aux protéines du lait de vache (**Schouten et al. 2012**).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  forment une petite sous population de cellules T avec un TCR particulier composé d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$ . Elles sont très présentes parmi la population des lymphocytes intra-épithéliaux de l'intestin. Selon les données extraites de la revue de Untersmayr (**Untersmayr and Jensen-Jarolim 2006**), ces cellules seraient impliquées dans l'induction de la tolérance orale, mais auraient d'autre part, la capacité de produire des cytokines de type Th2 comme l'IL-13 qui favorisent la production d'IgE et l'inflammation allergique. Elles sont en effet capables de reconnaître des antigènes intacts grâce à leur TCR particulier, sans présentation *via* les molécules du CMH ce qui contribue au développement de réponse de type Th2 en présence d'allergènes alimentaires au niveau des muqueuses. Ce type de lymphocytes peut également être impliqué dans l'induction de la tolérance orale (**Dupont 1997**).

La plupart des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent des antigènes via le CMH de classe I. Les autres sont impliqués dans la protection de l'hôte contre les affections virales et dans les réactions du greffon contre l'hôte. Ces lymphocytes jouent un rôle important dans le contrôle du système immunitaire (**Hisatsune et al. 1995**). Chez les animaux tolérisés de façon expérimentale aux caséines, ces cellules produisent des quantités importantes de TGF- $\beta$  comparées à celles des animaux témoins. Une étude récente a décrit le rôle de ces cellules dans la diminution de l'inflammation pulmonaire provoquée par la sensibilisation expérimentale à l'ovalbumine. Dans cette étude, les cellules CD8<sup>+</sup> exercent leur action régulatrice en présence d'IFN- $\gamma$ . L'absence de cette cytokine induit une potentialisation de l'inflammation par les cellules CD8<sup>+</sup> (**Tang et al. 2012**).

## I.5. SYMPTÔMES CLINIQUES DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

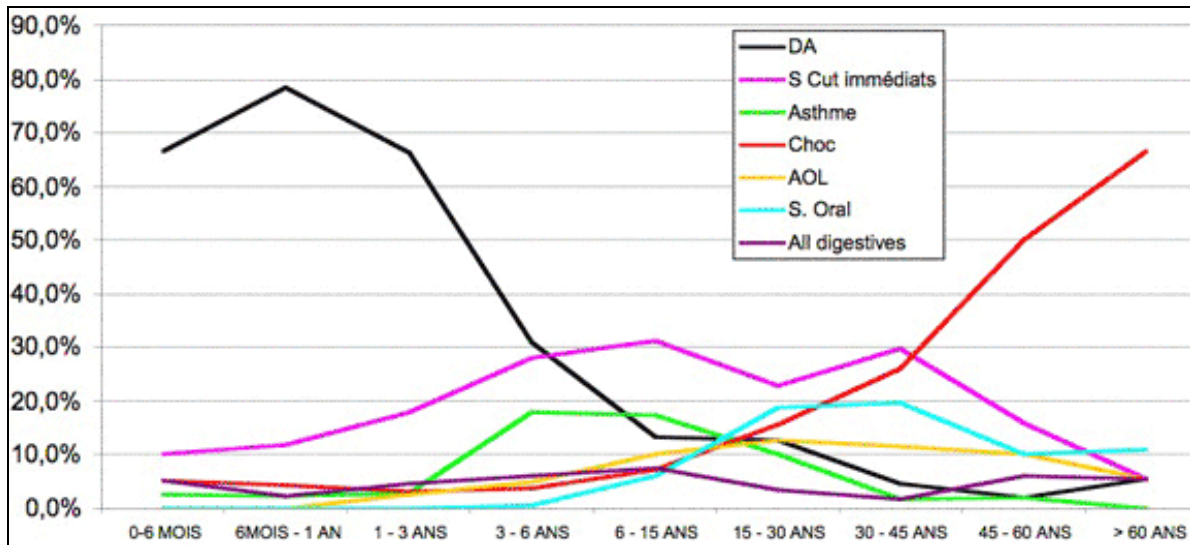
Les manifestations cliniques consécutives à l'ingestion d'aliments sont très diverses et touchent souvent plusieurs organes. Elles se modifient avec l'âge avec une tendance générale à l'aggravation. Ces manifestations varient en fonction du mécanisme impliqué. Les symptômes les plus courants sont rapportés dans le **Tableau 2**.

Type de réactions	Tableau clinique	Organe cible	Symptomatologie
Cutanées	Dermatite atopique	Peau	- Lésions d'eczéma (mal limitées, érythémateuses) sur le visage, faces d'extension des membres, siège, plis de flexion. - Prurit
	Urticaire	Peau	- Dermatose éruptive due à un œdème dermique secondaire à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité capillaire. - Présence de papules roses, oedémateuses, prurigineuses
	Œdème de Quincke	Muqueuses	- Dermatose due à un œdème hypodermique pouvant être fatal s'il touche les muqueuses pharyngo-laryngée. - Tumefaction blanc rose, non prurigineuse mais accompagnée d'une sensation de tension.
Oro-pharyngées	Syndrome oral de Lessof	Muqueuse buccale	- Prurit et œdème labial, gingival, buccal, voire un œdème laryngé
	Rhinite	Muqueuse nasale	- Rhinorrhée, obstruction et prurit nasal (inflammation de la muqueuse), éternuements parfois accompagnés de conjonctivite ou de toux.
Respiratoires	Asthme	Poumon	- Constriction bronchique conduisant à une gêne respiratoire, avec dyspnée. L'asthme aigu grave a un pronostic vital.
Gastro-intestinales	Varié	Tube digestif	- Epigastralgies - Nausées, vomissements - Douleurs abdominales - Episodes diarrhéiques
Systémiques	Choc anaphylactique		- Choc hypovolémique avec collapsus cardiovasculaire, provoqué par une vasodilatation primitive périphérique liée à la libération massive de médiateurs. - Mise en jeu du pronostic vital

**Tableau 2. Signes cliniques de l'allergie alimentaire**

Extrait de (Ancelin 2004)

La dermatite atopique est la principale manifestation de l'allergie alimentaire chez l'enfant (Bidat 2006). Les données du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA, juin 2009) suggèrent que jusqu'à 80% des dermatites atopiques dues à une allergie alimentaire sont observées chez le petit enfant (Figure 11).



**Figure 11: Fréquence relative de 7 tableaux cliniques en fonction de l'âge**

DA : Dermate atopique, S Cut immédiats : Symptômes cutanés immédiats, AOL Angio œdème laryngé, S Oral : Syndrome Oral, All digestives : Allergies digestives

Données du CICBAA, juin 2009. Disponible sur : <http://www.cicbaa.com>

Les autres signes cutanés comportent l'urticaire aiguë et l'angio œdème (plus souvent localisés au niveau du visage et notamment sur les lèvres et les paupières). L'œdème hypodermique appelé œdème de Quincke peut être plus ou moins étendu et grave quand il atteint le larynx.

Les symptômes digestifs les plus fréquents sont les nausées, les vomissements, les diarrhées et les douleurs abdominales. Le syndrome oral dû à l'ingestion de fruits est localisé au niveau de la sphère oro-pharyngée (picotement vélopalatin, œdème des lèvres, dysphagie).

L'asthme bronchique représente la manifestation respiratoire la plus grave. Mais il peut s'agir de rhino-conjonctivites ou plus simplement des toux et des crises d'éternuements.

Les manifestations généralisées peuvent mettre en jeu le pronostic vital. Les premiers signes cliniques peuvent être observés au niveau de la sphère oro-pharyngée par exemple puis d'autres symptômes peuvent intéresser tous les organes notamment ceux des systèmes respiratoire et cardiovasculaire. Le choc anaphylactique dû à l'état de choc vasculaire associé aux spasmes bronchiques (vasodilatation et collapsus) est un accident brutal qui intervient souvent dans les minutes qui suivent l'ingestion de l'aliment même si parfois il peut apparaître au bout de quelques heures.

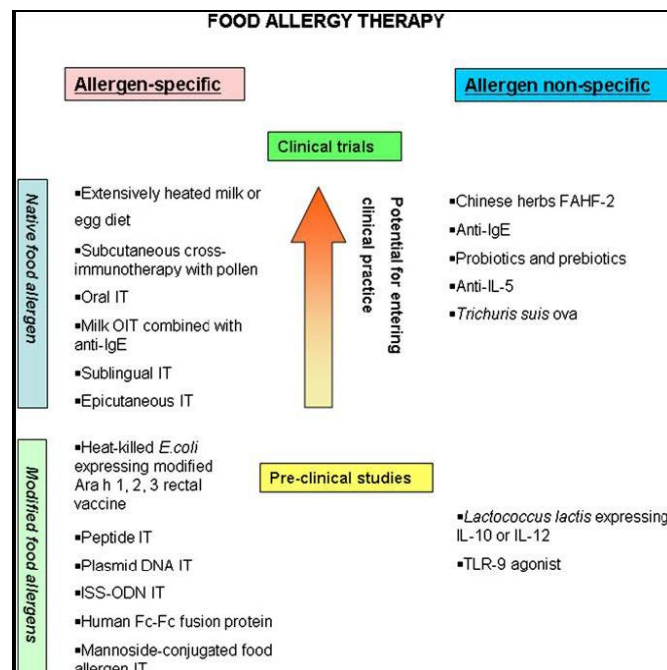
## I.6. ASPECTS THÉRAPEUTIQUES

Les traitements de l'allergie alimentaire sont principalement préventifs et symptomatiques. Le régime d'éviction de l'allergène est la première étape de la prise en charge de l'allergie alimentaire. Ce traitement consiste à éliminer les aliments responsables des réactions. Il est indispensable en raison du risque de réaction anaphylactique pouvant survenir lors d'une ingestion. Il peut aussi être instauré de manière préventive chez la femme enceinte ou allaitante ainsi que chez le nourrisson.

Les traitements médicamenteux ont pour objectif de limiter certaines manifestations cliniques mais ne doivent pas être substitués au régime d'éviction. Par exemple, les antihistaminiques s'opposent aux effets de l'histamine et autres médiateurs et les corticoïdes sont destinés à lutter contre les inflammations.

Le traitement d'urgence en cas de choc anaphylactique repose sur la prise d'adrénaline. Cette hormone induit une vasoconstriction périphérique et agit sur le rythme cardiaque. Elle exerce également une action relaxante sur les muscles bronchiques et elle inhibe la libération des médiateurs de l'inflammation et de l'allergie.

Ces dernières années, l'émergence de nouvelles thérapies spécifiques ou non de l'allergène permettent d'entrevoir des solutions différentes du régime d'éviction (**Figure 12**).



**Figure 12: Futures thérapies de l'allergie alimentaire**

Extrait de (Nowak-Węgrzyn and Sampson 2011)

Ces nouvelles thérapies regroupent l'immunothérapie spécifique par voie orale, sublinguale et épicutanée, les vaccins recombinants obtenus à partir d'allergène modifié ou combiné avec des adjuvants bactériens permettant de favoriser l'induction d'un mécanisme Th1 ou encore le développement d'anticorps anti-IgE capables de limiter la fixation des IgE spécifiques à leurs récepteurs.

Selon diverses études l'administration de bactéries définies comme étant des probiotiques pourraient prévenir certaines maladies allergiques (Michail 2009, Lodinová-Zádníková et al. 2004). Selon la définition proposée par le groupe de travail formé par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO : *Food Agriculture Organization*) et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), les probiotiques sont des microorganismes vivants dont l'administration à des quantités adéquates est bénéfique pour la santé de l'hôte (FAO/WHO 2002). Les probiotiques sont en général des souches bactériennes appartenant aux genres bifidobactérie ou lactobacille dont l'ingestion augmente les taux de ces micro-organismes bénéfiques (Forsythe and Bienenstock 2010). L'utilisation de probiotiques en pédiatrie a donné des résultats encourageants dans le cas du traitement de l'eczéma atopique (Isolauri et al. 2000). Une étude a montré que les effets bénéfiques des probiotiques dans le cas du traitement de la dermatite atopique sont dus à une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  (Prescott et al. 2005). Malgré ces résultats encourageants, il n'existe pas de données cliniques qui permettent d'établir de façon catégorique le rôle bénéfique des probiotiques dans la prévention des maladies allergiques (Yao et al. 2010).

## **I.7. FACTEURS DE RISQUES**

La réaction allergique est le résultat de l'interaction de plusieurs paramètres qui orientent la réponse immunitaire suite à un premier contact avec un antigène. Différents facteurs de risques peuvent intervenir. Ils sont principalement liés à l'allergène alimentaire (nature, dose, voie d'exposition...), à l'individu (fond génétique, âge, sexe...) et aussi aux conditions de l'environnement associé à l'individu (perméabilité intestinale, microbiote intestinal, pollution, tabagisme...).

## **I.7.1. Les allergènes alimentaires**

### **I.7.1.1. Généralités**

Le risque de développer une allergie alimentaire est lié à la consommation de certains aliments et aux caractéristiques des allergènes alimentaires. Ce risque est influencé par le taux d'allergènes majeurs contenus dans l'aliment.

La plupart des allergènes sont des glycoprotéines appartenant à la famille des albumines (solubles dans l'eau) ou des globulines (solubles dans les solutions salines). Dans des cas plus rares, les allergènes peuvent être solubles dans l'alcool comme par exemple les gliadines.

Le potentiel allergénique de certaines protéines alimentaires est dû à la présence de déterminants antigéniques (épitope) pouvant réagir avec les lymphocytes T (épitope T) ou pouvant se lier aux IgE ou aux lymphocytes B (épitope B). Certains épitopes sont dits thermostables c'est dire qu'ils sont capables de résister à la dénaturation thermique (ovalbumine, caséines, allergènes de poisson). D'autres pourront résister à la protéolyse ( $\beta$ -lactoglobuline) ou à des pH acides comme certains allergènes de l'arachide. Les technologies agroalimentaires peuvent également avoir des conséquences sur l'allergénicité des protéines alimentaires.

Les allergènes peuvent causer des allergies croisées dues à la présence d'IgE spécifiques d'un allergène mais capables de réagir avec plusieurs allergènes différents qui présentent une homologie immunochimique.

### **I.7.1.2. Les protéines et allergènes du lait de vache**

Le lait de vache est considéré comme un aliment complet, équilibré en nutriments et riches en minéraux. De ce fait, il est très largement consommé sur l'ensemble de la planète principalement par les enfants mais aussi par les adultes, sous forme de produits liquides ou de produits transformés. La présence du lait est bien connue dans des aliments simples tels que les fromages, yaourts et le beurre. En revanche on le retrouve dans d'autres produits sous forme d'allergènes masqués (saumon fumé, soupes, cosmétiques, baume dentaire...).



## Caractéristiques de l'allergie aux protéines du lait de vache

L'allergie au lait de vache, à distinguer des intolérances au lait ou au lactose associées à un déficit enzymatique en lactase, peut être médiée ou non par les IgE. Le mécanisme immunologique associé à la forme non médiée par les IgE n'est pas encore précisément déterminé mais est associé à l'activation excessive de certaines cellules du système immunitaire (lymphocytes Th2, éosinophiles, ...) (**Benhamou et al. 2009**).

L'allergie aux protéines du lait de vache est la première allergie alimentaire rencontrée au cours de la vie, le lait étant le premier aliment consommé. Par conséquent, cette allergie touche surtout les nourrissons et les enfants. En effet, la plupart des enfants allergiques développent des symptômes avant l'âge de 12 mois, souvent dans la semaine suivant le sevrage avec l'introduction de formule infantile à base de lait de vache. Cependant, des cas de développement d'allergie au lait de vache ont été décrits à tous âges (**Benhamou et al. 2009**). Dans les pays industrialisés 2 à 3% des enfants souffrent d'allergie au lait de vache et la plupart des enfants guérissent avant l'âge de cinq ans. Toutefois, des études récentes rapportent que certains patients acquièrent la tolérance à un âge plus tardif (**Skripak et al. 2007, Cantani and Micera 2004**). Cependant, l'allergie au lait de vache médiée par les IgE prédispose au développement de l'asthme et d'autres allergies alimentaires chez l'adulte (**Schäfer et al. 2001, Høst 2002**). En effet différentes études indiquent que le développement d'une allergie alimentaire durant l'enfance peut annoncer l'initiation de la « marche allergique » et par conséquent induire le développement de maladies allergiques (**Malmberg et al. 2010**).

Les manifestations cliniques de l'allergie au lait de vache sont principalement cutanées ou gastro-intestinales. Selon une étude, les manifestations cutanées (urticaire) apparaissent dans 85% des cas, le système gastro-intestinal est touché dans 46% des cas (vomissements, diarrhée, constipation), le système respiratoire inférieur dans 14% des cas, et supérieur dans 6% des cas (**Skripak et al. 2007**). Les symptômes cutanés restent les plus fréquents cependant le choc anaphylactique peut apparaître dans 20% des cas sans impliquer la peau, surtout chez les enfants (**Benhamou et al. 2009**). Une étude a observé que les symptômes de l'allergie alimentaire au lait de vache chez l'adulte sont plus sévères dans 67% des cas (**Lam et al. 2008**). Cette allergie est décrite comme responsable de 13% des réactions anaphylactiques mortelles induites par un allergène alimentaire (**Bock, Muñoz-Furlong and Sampson 2007**).

### Caractéristiques des protéines du lait de vache

Le lait de vache a un taux protéique estimé à environ 35g/L. Ce lait contient plus de 25 protéines différentes pouvant être réparties dans deux groupes en fonction de leurs propriétés. Le lait coagulé (lait caillé) est constitué de protéines qui précipitent sous l'action de la présure à pH 4,6. Ces protéines sont les caséines et représentent 80% des protéines totales. Les 20% restants correspondent aux protéines contenues dans la fraction soluble, le lactosérum ou petit lait (5g/L). Cette fraction contient essentiellement des protéines globulaires solubles dans l'eau. La  $\beta$ -lactoglobuline bovine (BLG) et l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -Lac) sont les protéines majeures du lactosérum. D'autres protéines provenant du sang sont également présentes (sérum albumine bovine (SAB), immunoglobulines et traces de lactoferrine) (**Tableau 3**).

<u>Protéines</u>		<u>Concentration</u>	<u>Masse molaire</u>
<b>(Concentration des Protéines du lait de vache (%))</b>		<b>(g/L)</b>	<b>(kDa)</b>
Lactosérum (20%) (Environ 5g/L)	$\beta$ -lactoglobuline (10%) <b>Bos d 5</b>	3-4	18,3
	$\alpha$ -Lactalbumine (5%) <b>Bos d 4</b>	1-1,5	14,2
	Immunoglobulines (3%) <b>Bos d 7</b>	0,6-1	150
	Sérum Albumine bovine (1%) <b>Bos d 6</b>	0,1-0,4	66 ,3
	Lactoferrine (traces)	0,09	80
Caséine <b>(Bos d 8)</b> (80%) (Environ 30g/L)	Caséine $\alpha$ -S1 (32%)	12-15	23,6
	Caséine $\alpha$ -S2 (10%)	3-4	25,2
	Caséine $\beta$ (28%)	9-11	24,0
	Caséine $\kappa$ (10%)	3-4	19

**Tableau 3. Principales caractéristiques des protéines et des allergènes (Bos d 4 à 8) du lait de vache**

D'après (Wal 1998, Wal 2002)

La BLG, n'a pas d'homologue dans le lait humain et représente 10 % des protéines du lait de vache soit environ 2 à 4 g par litre de lait. Cette protéine est digérée au niveau de l'intestin par la trypsine et la chymotrypsine étant donné qu'elle est résistante à la pepsine et au pH gastrique.

L' $\alpha$ -Lac est une protéine globulaire monomérique qui participe à la régulation de la galactosyl-transférase responsable de la synthèse du lactose. L' $\alpha$ -Lac bovine présente de fortes homologies de séquence et de structure avec le lysozyme du blanc d'œuf de poule, mais aussi avec l' $\alpha$ -Lac humaine.

La fraction caséine entière est constituée par quatre protéines. Les caséines  $\alpha$ S1 (23,6 kDa),  $\alpha$ S2 (25,2 kDa),  $\beta$  (24 kDa), et  $\kappa$  (19 kDa) représentent respectivement 32%, 10%, 28%

et 10% des protéines totales du lait. Ces protéines montrent peu d'homologie dans leurs séquences en acides aminés. Les caséines se lient entre elles pour former des agrégats (micelles) en suspension dans le lactosérum. La proportion des différentes caséines par rapport au contenu total en caséines est relativement constante dans les micelles (37% de caséines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  et 13% de caséines  $\beta$  et  $\kappa$ ). Ces micelles comprennent une partie centrale hydrophobe et une couche périphérique hydrophile où le fragment polaire C-terminal de la caséine  $\kappa$  est exposé. Les domaines polaires des autres caséines, pouvant lier le calcium (caséines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ ), contiennent des sites de phosphorylation qui sont également présentés à la surface des micelles. Les caséines ne sont pas affectées de manière significative par les traitements thermiques sévères mais sont très sensibles aux protéases et exopeptidases.

Il existe de nombreux variants de chaque protéine (polymorphisme génétique) ce qui rend ces protéines très hétérogènes. L'hétérogénéité se caractérise également par l'existence de modifications post-traductionnelles.

### **Caractéristiques des allergènes du lait de vache**

Les allergènes du lait de vache nommés *Bos domesticus* (Bos d) 2 à 8 comprennent la BLG (Bos d 5), l' $\alpha$ -lac (Bos d 4) et les caséines (Bos d 8), la SAB (Bos d 6) et les immunoglobulines (Bos d 7) (**Tableau 3**).

Des études sur une large population d'enfants allergiques au lait de vache ont révélé que les allergènes majeurs sont la BLG et la caséine  $\alpha_1$  (**Bahna 2002, Ruiter et al. 2007**). Une étude réalisée par Wal *et al.* rapporte en effet que les protéines les plus représentées au sein du lait de vache sont les plus fréquemment reconnues par les IgE de patients. Les caséines, la BLG et l' $\alpha$ -lac sont reconnues par respectivement 65%, 61% et 51% des IgE des patients allergiques (**Wal et al. 1995**). Cette tendance est confirmée dans une étude qui indique cependant une augmentation des taux d'IgE spécifiques des caséines par rapport à ceux des protéines du lactosérum (65% de reconnaissance des caséines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , 75% pour la caséine  $\beta$ , 48% pour la caséine  $\kappa$ , 36% pour la BLG et 36% pour l' $\alpha$ -lac) (**Shek et al. 2005**), illustrant l'importance grandissante des caséines dans le développement de l'allergie au lait de vache.

Les enfants qui guérissent spontanément de leur allergie au lait de vache possèdent des IgE spécifiques majoritairement dirigés contre des épitopes conformationnels alors que ceux dont l'allergie persiste ont des IgE spécifiques des épitopes séquentiels (**Chatchatee et al. 2001, Vila et al. 2001, Järvinen et al. 2002**).

Les traitements technologiques appliqués au lait de vache ont la particularité de modifier les interactions entre les différentes protéines du lait. Il s'agit le plus souvent de traitements thermiques ou de procédés de fermentation (fabrication de fromages ou de yaourts). Les différents traitements thermiques comprennent entre autres des procédés de cuisson, de pasteurisation (chauffage à 72°C pendant 15 secondes et refroidissement immédiat), de stérilisation à Ultra Haute Température (UHT) (chauffage à 140°C pendant quelques secondes) ou de séchage (fabrication de poudre de lait).

La SAB (Bos d 6), les immunoglobulines (Bos d 7) et l' $\alpha$ -Lac (Bos d 4) sont thermolabiles et disparaissent si le lait est bouilli.

La BLG (Bos d 5) est sensible à la température (thermolabile) mais elle peut être protégée du fait des interactions avec la fraction caséine (Bos d 8) qui est thermostable. Cependant, différentes études montrent que la capacité de liaison entre la BLG et des IgE de patients allergiques n'est pas totalement inhibée par les traitements thermiques. Elle diminue tout de même de 50 à 75% par un chauffage à 74°C ou à 92°C de la protéine isolée, mise en solution dans de l'eau ou dans du lait (**Paajanen et al. 2003**). Une autre étude indique que 75 % des enfants tolèrent le lait de vache hautement chauffé à une température supérieure de celle de la pasteurisation et de l'UHT (176°C et 260°C) (**Nowak-Wegrzyn et al. 2008, Kim et al. 2011**). Par ailleurs, une dénaturation totale de la BLG par réduction chimique ne modifie pas la capacité de liaison aux IgE et peut même l'augmenter (**Sélo et al. 1999**) ce qui illustre la présence d'épitopes linéaires thermostables qui peuvent éventuellement être démasqués lors d'un traitement thermique.

### **I.7.2. Facteurs génétiques**

Ces facteurs sont responsables de la prédisposition au développement de maladies allergiques. Différentes études indiquent que l'hérédité joue un rôle indiscutable dans l'orientation de la réponse allergique. Si l'un des parents ou les deux parents présentent un phénotype atopique cela augmente les risques d'être atopique pour la descendance (**Ruiz, Kemeny and Price 1992**). Selon l'étude de la prévalence de l'allergie à l'arachide chez des jumeaux, 64% des jumeaux homozygotes partagent cette allergie ce qui souligne l'influence du terrain génétique (**Sicherer et al. 2000**). Des pourcentages de risque ont été établis de façon plus générale : le risque pour l'enfant de développer une allergie est de 30 à 50% si l'un

des parents est allergique et lorsque ce sont les deux parents, le risque est de 50 à 75% (**Renauld 2002**).

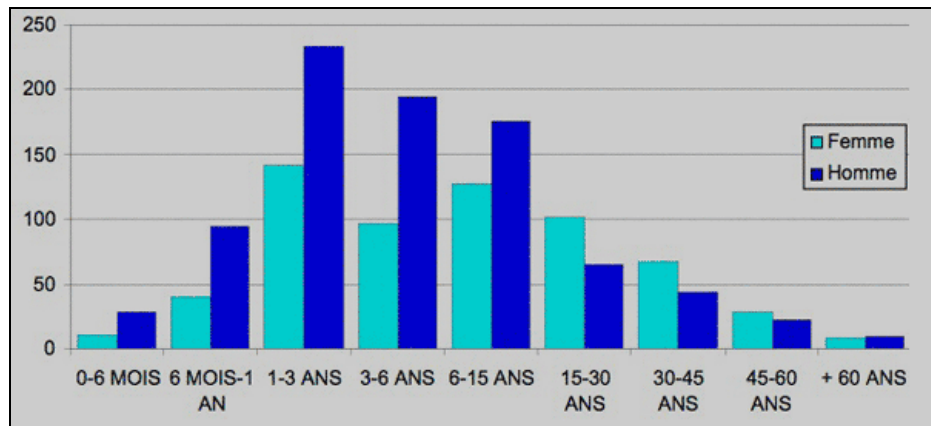
De nombreuses études sur le polymorphisme génétique établissent une relation entre l'état atopique d'un individu et certaines variations génétiques. Dans une population japonaise, le polymorphisme du gène de l'IL-10 a été associé à l'allergie alimentaire (**Campos Alberto et al. 2008**). D'autres variations ont été impliquées pour d'autres gènes de cytokines, en particulier celles produites par les lymphocytes Th2, comme l'IL-4, l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-9 (**Liu et al. 2004, Namkung et al. 2007, Wang et al. 2006**). Une étude a mis en évidence la relation entre le polymorphisme du gène du facteur de transcription et d'activation STAT-6 et l'allergie aux noix (**Amoli et al. 2002**). Le polymorphisme des gènes du CMH classe II joue également un rôle dans l'apparition de l'allergie à l'arachide et aux noix (**Howell et al. 1998, Hand et al. 2004**). Les SNPs (Single nucléotide polymorphisms) correspondent à un type de polymorphisme dans lequel deux chromosomes diffèrent par une seule paire de base sur un segment donné. Deux SNPs de la région du gène CD14 associée aux maladies atopiques ont été étudiés récemment. L'étude réalisée à partir de 53 patients allergiques à l'arachide et 64 patients tolérants, a révélé que les variations dans ces deux SNPs sont associées à la présence d'allergie à l'arachide, à l'augmentation des niveaux d'IgE totales et à la fréquence d'eczéma chez les patients allergiques (**Dreskin et al. 2011**).

### **I.7.3. Influence de l'âge et du sexe**

On peut également observer des différences liées à l'âge et au sexe de l'individu. La **Figure 13** présente l'incidence des allergies alimentaires selon l'âge et le sexe (données du CICBAA, juin 2009) en France. L'allergie alimentaire apparaît comme étant plus fréquente chez les enfants de sexe masculin jusqu'à l'âge de 15 ans. Au-delà de cet âge l'incidence est plus importante chez les individus de sexe féminin.

L'âge de l'individu au moment de l'introduction des aliments semble également jouer un rôle. Le nouveau-né possède en effet un système digestif immature capable d'absorber des protéines entières (**McNeish 1984**). Ce processus est nécessaire à l'acquisition d'une immunité passive grâce à l'absorption des immunoglobulines provenant du colostrum de la mère (**Drozdowski et al. 2010**). Cependant le passage d'une trop grande quantité de protéines alimentaires peut induire des allergies alimentaires. Dans ce contexte, les recommandations conseillaient la diversification alimentaire à partir de l'âge de 4 mois

(Halken and Høst 2001) et l'introduction des aliments potentiellement allergénique à l'âge d'un an.



**Figure 13: Incidence de l'allergie alimentaire selon le sexe et l'âge**

Données du CICBAA, juin 2009. Disponible sur : <http://www.cicbaa.com>

Cependant, ces recommandations sont controversées car aucune donnée scientifique ne permet de conclure de façon certaine que l'évitement ou l'introduction tardive des aliments potentiellement allergéniques réduisent le développement d'allergies chez les nouveaux-nés considérés à risque ou chez ceux qui ne présentent pas de risques (**European Food Safety Authority (EFSA), 2009**). Les recommandations actuelles préconisent ainsi une diversification alimentaire et l'introduction des aliments potentiellement allergéniques à partir de l'âge de 6 mois.

Des données de la littérature ont d'ailleurs mis en évidence des relations entre l'introduction tardive de l'aliment et le développement d'allergies. Par exemple, l'étude de Du Toit et al, rapporte que la prévalence de l'allergie à l'arachide était dix fois plus faible chez des enfants israéliens âgés de 8 à 14 mois qui consomment de l'arachide alors que les enfants britanniques du même âge n'en consomment pas (**Du Toit et al. 2008**). L'étude de Koplin et al, rapporte que l'introduction d'œufs cuits à l'âge de 4 à 6 mois pourrait avoir des effets protecteurs contre le développement de l'allergie aux œufs (**Koplin et al. 2010**).

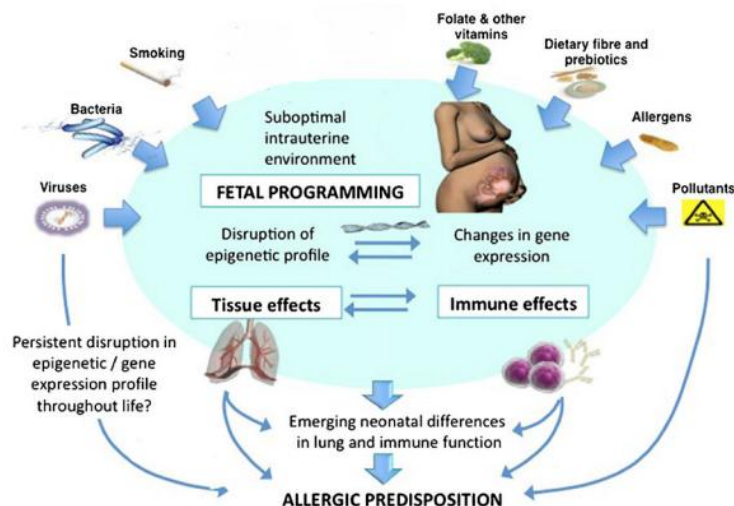
#### **I.7.4. Influence de l'environnement**

L'augmentation importante de l'incidence de l'allergie alimentaire ne peut être expliquée uniquement par des facteurs génétiques. Plusieurs études indiquent qu'en plus du

terrain génétique, des paramètres de l'environnement peuvent moduler l'apparition de réactions allergiques.

#### **I.7.4.1. Facteurs épigénétiques**

L'épigénétique concerne l'étude des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes, sans altération des séquences nucléotidiques. Cette discipline analyse l'influence de l'environnement cellulaire ou physiologique sur la régulation de l'expression ou l'inactivation des gènes. Selon les données publiées par Prescott et Saffery (**Prescott and Saffery 2011**) différentes études suggèrent qu'il existe de nombreux facteurs environnementaux qui agissent sur le développement du système immunitaire du fœtus durant la grossesse en étant capables d'induire des modifications épigénétiques stables pouvant être transmises aux générations suivantes (**Figure 14**).



**Figure 14 : Facteurs environnementaux impliqués dans la programmation du système immunitaire**

Extrait de (**Prescott and Saffery 2011**)

Ces facteurs regroupant l'exposition aux bactéries, le régime alimentaire mais aussi la pollution (fumée de cigarette, diesel, pesticides...) ont été mis en relation avec l'épidémie de maladies allergiques. Les suppléments alimentaires comme les folates (donneurs de groupement méthyle) ont également été mis en cause dans une étude où leur administration chez la souris augmentait les réactions allergiques touchant les voies respiratoires (**Hollingsworth et al. 2008**). Ces facteurs peuvent également agir sur la période post-natale et affecter le développement de réactions allergiques. Ces changements peuvent être transmis à la génération suivante ce qui peut amplifier les risques allergiques (**Prescott 2011**). Des études indiquent que la réduction de la stimulation bactérienne et de la diversité du microbiote

intestinal durant l'enfance pourrait être associée au maintien de la méthylation du gène de l'IFN- $\gamma$  au niveau des lymphocytes T naïfs diminuant ainsi la sécrétion de cette cytokine de type Th1 avec un risque associé d'augmentation des réponses allergiques (**Vuillermin et al. 2009**). D'autres études récentes ont mis en évidence l'importance de l'interaction gènes-environnement dans le processus de sensibilisation aux aliments. L'étude réalisée sur 970 enfants a observé que les enfants qui avaient été nourris (n = 739) au sein avaient 1,5 fois plus de risques de sensibilisation par rapport aux enfants non allaités (n = 231). Cependant l'étude révèle que l'allaitement représente un facteur de risque selon le génotype des enfants. Il apparaît que les effets de l'allaitement sur la sensibilisation aux aliments sont modifiés par le polymorphisme génétique associé à certains gènes (IL-12, TL-9 et TSLP : *Thymic Stromal Lymphopoietin*) (**Hong et al. 2011**).

#### **I.7.4.2. Influence de l'allaitement**

Certaines études indiquent que l'allaitement pourrait aider à prévenir le développement de maladies allergiques en stimulant la maturation du tractus gastro-intestinal, c'est pourquoi l'allaitement est préconisé en tant que stratégie de prévention (**Szajewska 2012**).

Une étude réalisée sur 750 enfants souffrant de dermatite atopique a observé que l'augmentation de la durée de l'allaitement en plus de la diversification alimentaire tardive, diminue les risques de dermatite atopique chez l'enfant (**Farajzadeh et al. 2011**). Cependant, Purvis et al ont démontré que la durée de l'allaitement était associée à une augmentation de la dermatite atopique chez les enfants néo-zélandais âgés de 3,5 ans (**Purvis et al. 2005**). Une autre étude réalisée au Japon a observé que le lait maternel augmentait légèrement le risque de dermatite atopique (**Nakamura et al. 1999**). De ce fait, les effets protecteurs de l'allaitement sont encore discutés car des études rapportent des effets protecteurs, d'autres n'observent aucun effet et certaines observent des effets aggravants.

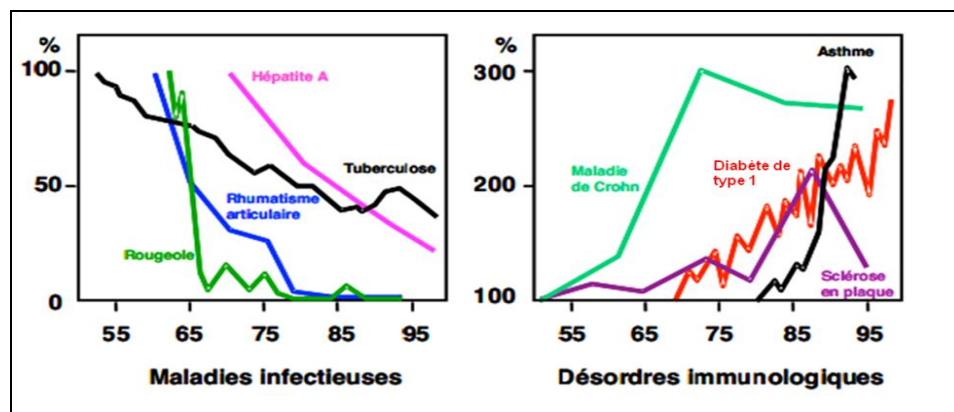
Selon les travaux de Verhasselt et al. à l'aide de modèles souris, certains éléments du lait maternel, non retrouvés dans les laits artificiels, pourraient lui conférer un rôle protecteur dans le développement d'une allergie alimentaire en favorisant l'induction de la tolérance orale. Ces éléments (antigènes alimentaires, anticorps spécifiques, TGF- $\beta$ , IL-10...) sont capables d'agir directement sur le système immunitaire du nouveau-né (**Verhasselt 2010b**). D'autres facteurs comme les oligosaccharides peuvent stimuler le développement du



microbiote intestinal et donc indirectement la maturation du système immunitaire (**Verhasselt 2010a**).

### **I.7.4.3. L'hypothèse hygiéniste**

La théorie hygiéniste, proposée en 1989 par David Strachan, un épidémiologiste anglais, suggère que les facteurs influençant les conditions d'une exposition aux microorganismes pathogènes comme la taille de l'habitat, les installations sanitaires, l'ordre de naissance et l'utilisation d'antibiotiques peuvent expliquer l'augmentation de la prévalence des maladies atopiques comme l'eczéma, le rhume des foins ou l'asthme, dans les pays ayant adoptés un style de vie moderne (**Strachan 1989**). Différentes études renforcent cette théorie. Par exemple, l'exposition à des pathogènes comme *Helicobacter pylori* ou *Mycoplasma tuberculosis* est associée à une diminution de l'incidence des maladies allergiques (**Ege et al. 2011, Bach 2002, Feary, Britton and Leonardi-Bee 2011**). Un autre facteur protecteur concerne le fait de grandir dans un environnement fermier, incluant la consommation de lait cru et des contacts avec les animaux fermiers comme les vaches (**von Mutius and Vercelli 2010**). L'effet protecteur de cet environnement semble être du à la présence d'une multitude de variétés de microorganismes augmentant l'exposition aux bactéries de l'environnement (**Ege et al. 2011**). L'ensemble de ces résultats montrent que la réduction de l'exposition aux bactéries environnementales causées par les conditions d'hygiène strictes appliquées dans les pays industrialisés, peut contribuer à l'augmentation de l'incidence des maladies médiées par le système immunitaire comme les allergies (**Wills-Karp, Santeliz and Karp 2001**). Les observations de Bach (**Figure 15**) montrent cependant une augmentation de l'incidence des maladies inflammatoires induites par des réponses de type Th1 et Th17 en même temps que l'augmentation des maladies induites par des réponses de type Th2 (allergie). Ces données indiquent l'existence d'un déséquilibre important au niveau du système immunitaire.



**Figure 15: Evolution de l'incidence des infections et des maladies autoimmunes et allergiques dans les pays industrialisés durant les quatre dernières décennies**

D'après (Bach 2002)

L'hypothèse hygiéniste prenant en compte les bactéries commensales du microbiote intestinal qui représente un écosystème important (cf partie 2) a donné naissance à l'hypothèse du microbiote ou « *microflora hypothesis* » qui suggère que la diminution de l'exposition à des microorganismes due au style de vie (changements de régime, utilisation d'antibiotiques...) entraîne la constitution d'un microbiote intestinal sous-développé qui retarde la maturation du système immunitaire. Par conséquent, l'augmentation de la prévalence des allergies serait due à l'interruption des séquences d'évènements conduisant normalement au développement de la tolérance immunologique (Noverr and Huffnagle 2005). Cette hypothèse est basée sur le fait que pendant la grossesse les profils de réponse (mère et fœtus) sont orientés vers un phénotype Th2 permettant au fœtus d'être toléré par la mère. Cette orientation en faveur du profil Th2 favorise cependant, le développement d'une réponse allergique à la naissance. Dès la naissance, le nouveau-né est exposé aux bactéries, virus et parasites provenant de l'environnement. Cette exposition va permettre l'établissement du microbiote intestinal. La colonisation bactérienne stimule la maturation du système immunitaire *via* la production de LTh1 permettant à l'enfant de lutter contre des agents pathogènes mais aussi de cellules régulatrices permettant d'assurer le maintien de l'intégrité de l'organisme. Cette hypothèse est également corroborée par le fait que l'utilisation d'antibiotiques au cours des périodes précoces du développement pouvant altérer le microbiote intestinal est associée à une augmentation du risque d'allergie (McKeever et al. 2002). Les relations étroites entre le microbiote intestinal et le développement des allergies alimentaires seront définies au cours des chapitres suivants.

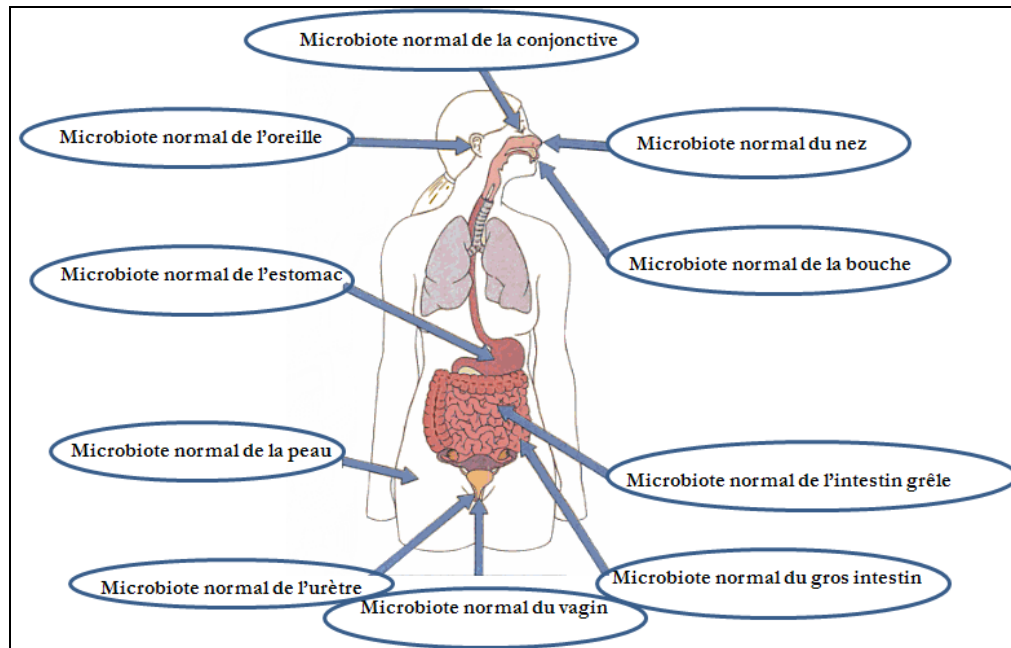
## **II. LE MICROBIOTE INTESTINAL**

---

### **II.1. DEFINITION**

Les mammifères vivent en permanence une relation symbiotique avec des bactéries dites commensales du fait de leur capacité à coloniser les revêtements cutanéomuqueux d'un hôte sans entraîner de désordres. L'écosystème formé par ces microorganismes résidents est

appelé microbiote (anciennement microflore ou flore). L'organisme humain est caractérisé par la présence de nombreux microbiotes qui agissent sur sa santé (**Figure 16**).



**Figure 16: Les différents écosystèmes bactériens (microbiotes) associés à l'être humain**

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble de la population de microorganismes vivant au sein du tractus gastro-intestinal en accord avec l'hôte. Il est composé de nombreuses espèces bactériennes, et est de loin le microbiote le plus peuplé et le plus complexe (**Raibaud and Ducluzeau 1989**). Le tractus gastro-intestinal, constitue en effet un site attractif pour la colonisation bactérienne, du fait de sa grande surface de contact et sa richesse en molécules pouvant être utilisées en tant que « nutriments » par les microorganismes. Ces bactéries entretiennent une relation en équilibre avec les cellules intestinales de l'hôte ainsi qu'avec les nombreuses substances qui transitent au sein du tractus gastro-intestinal.

## **II.2. MÉTHODE D'ANALYSE DU MICROBIOTE INTESTINAL**

### **II.2.1. Méthodes basées sur la culture**

Le microbiote intestinal, et en particulier le microbiote fécal, a d'abord été étudié à l'aide de techniques de culture *in vitro* notamment grâce au développement de techniques permettant l'anaérobiose (culture en absence d'oxygène). D'autres progrès permettant l'amélioration des conditions de culture ont permis d'isoler et de répertorier de nombreuses

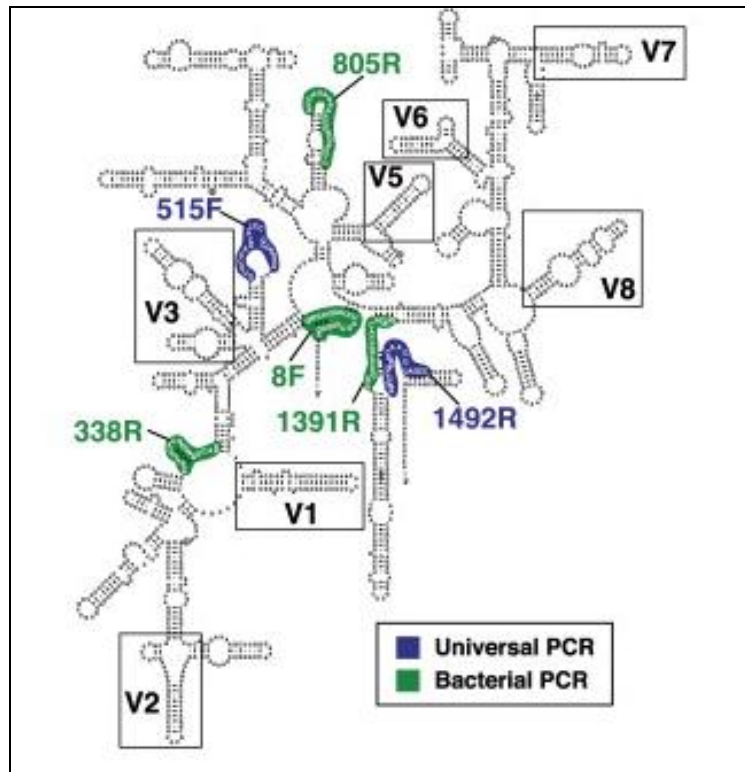
espèces dominantes du microbiote fécal selon les règles de la taxonomie classique (**Zoetendal, Rajilic-Stojanovic and de Vos 2008**) englobant la classification, la nomenclature et l'identification.

Ces techniques sont cependant limitées dans leur capacité à distinguer des bactéries de différents groupes phylogénétiques. Une autre difficulté réside dans le fait que la majorité des bactéries du microbiote appartiennent à des espèces anaérobies strictes. Plus de 80% des bactéries du microbiote ne peuvent être cultivées en laboratoire (**Eckburg et al. 2005**). Le manque de données sur les conditions de croissance de certaines bactéries, la sélectivité des milieux utilisés ainsi que le stress dû aux conditions de culture sont d'autres limites qui s'ajoutent aux difficultés liés à la simulation des interactions entre les bactéries et les autres microorganismes ou les cellules de l'hôte (**Stanghellini et al. 2010**). Ces limites ont poussé les microbiologistes à se tourner vers des méthodes d'analyse indépendantes de la culture.

## **II.2.2. Les méthodes moléculaires**

Les techniques moléculaires ont tout d'abord été utilisées en écologie microbienne dans le but de caractériser des bactéries appartenant à des communautés complexes (milieu marin, sol) (**Sekirov et al. 2010**).

Ces techniques sont basées sur l'utilisation de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) bactérien en tant que marqueur de la diversité génétique. En effet, le gène codant l'ARNr 16S (ADNr 16S) présente différentes caractéristiques intéressantes. En plus de sa petite taille (environ 1,5kb), il est présent chez toutes les bactéries et comporte des séquences très conservées qui permettent d'identifier des bactéries appartenant aux mêmes groupes phylogénétiques et aussi des séquences variables qui permettent de distinguer des espèces et des souches bactériennes (**Figure 17**).



**Figure 17: Représentation de la structure du gène codant l'ARN ribosomal 16S bactérien**

Le gène de l'ARN 16S de la sous-unité du ribosome bactérien possède des régions conservées et des régions variables (V1 à V8). Extrait de (Peterson et al. 2008)

La plupart des méthodes indépendantes de la culture sont basées sur l'analyse comparative de l'ARNr 16S. La revue publiée par Serikov *et al.* en 2010 (Sekirov et al. 2010) présente différentes techniques indépendantes de la culture comportant chacune des avantages et des limites. Parmi les méthodes basées sur l'analyse de l'ARNr 16S, on retrouve entre autres, les méthodes de séquençage, les méthodes d'empreintes (électrophorèse en milieu dénaturant), les puces à ADN, la PCR quantitative et l'hybridation *in-situ* couplée à la cytométrie en flux (FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization). Ces méthodes permettent d'évaluer la composition mais ne donnent pas d'informations concernant les fonctions de ce microbote. La compréhension de ce réseau complexe a nécessité le développement de nouvelles approches basées sur la métagénomique, se référant à l'étude des génomes de l'ensemble des organismes présents dans un échantillon.

### **II.2.2.1. Les méthodes d'empreintes**

Ces méthodes regroupent des techniques qui permettent d'obtenir le profil des séquences d'ADN de la communauté bactérienne contenue dans un échantillon. Elles permettent donc de comparer des échantillons en fonction des différences de profils

observées. Elles nécessitent au préalable une étape d'amplification de l'ADNr 16S par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). Les séquences ainsi amplifiées sont ensuite séparées sur un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes en fonction de leur composition en bases G + C. Le résultat de la migration sur gel permet d'observer des bandes distinctes correspondant à chaque séquence ce qui permet de visualiser la diversité bactérienne.

La dénaturation peut être effectuée par un gradient chimique (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) ou un gradient thermique (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis : TTGE). Des outils statistiques peuvent être utilisés pour calculer les différences entre les profils et donc repérer des changements en fonction des conditions. Elles sont d'ailleurs utilisées de façon courante pour comparer la diversité bactérienne au sein de différents échantillons et suivre les variations en fonction de certaines conditions (temps, traitement). Ces méthodes sont rapides et relativement peu coûteuses. Cependant, elles sont limitées dans l'apport d'informations phylogénétiques.

#### **II.2.2.2. L'hybridation in situ couplée à la cytométrie en flux**

Cette technique (FISH) utilise des sondes oligonucléotidiques fluorescentes fabriquées pour s'hybrider avec des séquences d'ARNr 16S uniques pour le groupe bactérien ciblé. L'analyse des résultats s'effectue à l'aide de la cytométrie en flux. Le choix des sondes permet de distinguer le niveau phylogénétique, par exemple des bactéries de la même espèce ou la même souche. Une étude rapporte qu'un ensemble de 15 sondes permettrait de caractériser environ 90% des bactéries d'un microbiote intestinal normal (**Harmsen et al. 2002**). Cette technique quantitative est utilisée comme outil en recherche clinique pour comparer la composition du microbiote intestinal d'individus sains et malades notamment dans le cas de l'atopie (**Kalliomäki et al. 2001**).

#### **II.2.2.3. La PCR quantitative (qPCR)**

Cette technique utilise des amorces spécifiques qui ciblent des groupes de bactéries pour l'amplification par PCR de l'ADNr 16S extrait de l'échantillon. Cela permet d'évaluer la quantité des bactéries recherchées par rapport au total.

Comme la FISH, cette technique permet l'identification de bactéries recherchées à l'aide de sondes spécifiques et pose donc des limites dans le cas de l'identification de nouvelles espèces bactériennes.

#### **II.2.2.4. Les méthodes de séquençage**

Ces méthodes permettent une analyse globale du microbiote intestinal. Elles sont cependant coûteuses et l'exploitation des données requièrent une longue analyse bioinformatique.

##### **II.2.2.4.a. La technique de séquençage complet**

La technique de séquençage complet (*Full-length 16S rRNA sequencing*) permet d'analyser la diversité des bactéries en classant les séquences d'ARNr 16S en unités taxonomiques opérationnelles (OTU : Operational Taxonomic Units) selon le pourcentage d'identité de séquences.

Les OTU sont des indicateurs des différents niveaux de résolution taxonomique. Ainsi, les OTU rassemblant des séquences comportant 99% de similarité désignent une souche bactérienne. Des pourcentages supérieurs ou égaux à 97%, 95% et 90% indiquent respectivement, une espèce, un genre et une famille.

##### **II.2.2.4.b. La technique de pyroséquençage**

Cette technique de séquençage à haut débit utilisée pour amplifier des régions variables ciblées dans le gène de l'ARNr 16S apporte une meilleure résolution taxonomique. Elle permet de séquencer en quatre heures environ 25 millions de bases avec 99% d'exactitude. L'utilisation d'amorces définies par un code barre servant à suivre certaines séquences spécifiques d'un échantillon permet de séquencer plusieurs échantillons en même temps.

#### **II.2.2.5. La métagénomique**

Cette technique implique le séquençage de l'ensemble des séquences d'ADN contenus dans un échantillon suivi d'une analyse bioinformatique permettant d'identifier les bactéries ainsi que les gènes présents. Ces informations peuvent être utilisées pour distinguer les caractéristiques fonctionnelles et le rôle biologique du microbiote intestinal dans des conditions normales ou pathologiques.

La complexité du génome associé au microbiote intestinal (microbiome) a été rapportée par différentes études et cela a conduit à l'établissement du concept de « super-organe ». Une étude basée sur l'analyse du microbiome intestinal a révélé des différences de fonctions et des variations interindividuelles dans la composition en gènes chez des enfants en

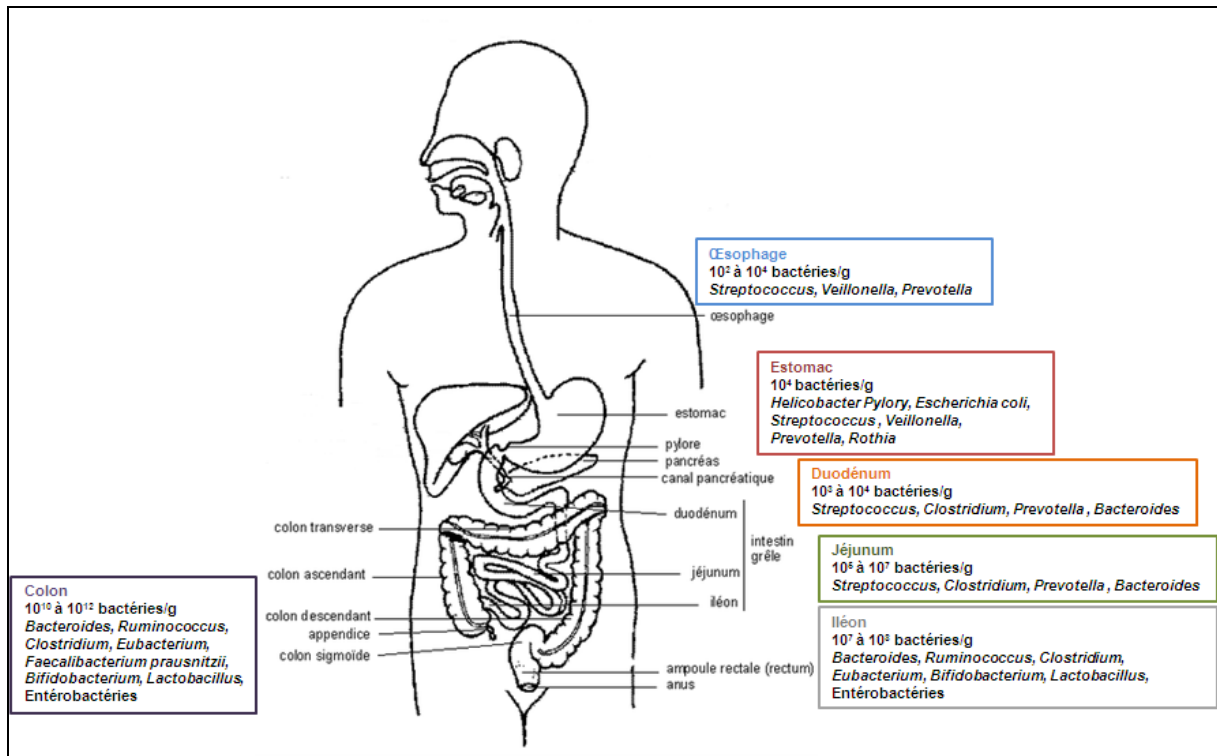
bas-âge. Cependant, l'analyse chez des enfants sevrés et chez des adultes montre l'existence de fonctions redondantes (**Kurokawa et al. 2007**). Ces résultats indiquent que le microbiote intestinal est constitué de noyaux fonctionnels. Cette technique a également été utilisée pour démontrer que la déviation de poids observée chez les souris obèses par rapport à des souris normales est corrélée avec la perte de plusieurs noyaux fonctionnels (**Turnbaugh et al. 2008**). Elle est cependant limitée par le nombre de séquences génomiques disponibles dans les banques de données.

### **II.3. COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL**

Le nombre de microorganismes constituant ce microbiote est estimé à environ  $10^{14}$ , ce qui représente 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (**Savage 1977, Whitman, Coleman and Wiebe 1998, Ley, Peterson and Gordon 2006**). D'après Schloss et Handelsman, le microbiote intestinal humain est composé de bactéries appartenant à plus de 50 groupes phylogénétiques (phyla) (**Schloss and Handelsman 2004**). Cependant, la composition dominante comprend deux phyla majeurs : *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Des proportions moins importantes sont retrouvées pour d'autres phyla comme *Actinobacteria* et *Proteobacteria* qui restent tout de même majoritaires par rapport à des phyla comme *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* ou *Cyanobacteria* (**Eckburg et al. 2005**). Les *Firmicutes* regroupent surtout les espèces anaérobies à Gram positif, très sensibles à l'oxygène et les *Bacteroidetes* correspondent aux bactéries anaérobies à Gram négatif. Les mêmes phyla sont présents le long du tractus gastro-intestinal avec des variations de proportion en fonction du compartiment de ce tractus : on observe en effet, un gradient de concentration croissant dans le sens oral-anal (**Figure 18**).

L'œsophage contient un microbiote principalement transitoire mais une étude révèle l'existence d'un microbiote résident dans sa partie distale avec une majorité de bactéries appartenant aux phyla *Firmicutes* (*Streptococcus* et *Veillonella*) et *Bacteroidetes* (*Prevotella*) (**Pei et al. 2004**).





**Figure 18: Le microbiote associé au tractus gastro-intestinal humain**

D'après (Coudeyras and Forestier 2010)

La quantité de bactéries présentes dans l'estomac a été estimée à environ  $10^4$  colonies formant des unités (CFU) par gramme de contenu digestif. Ces bactéries doivent supporter des conditions de pH très acide. Les Protéobactéries sont les composants majoritaires. Le genre *Helicobacter Pylori* est dominant mais d'autres genres comme *Escherichia* ou *Acinetobacter* sont également présents (Bik et al. 2006). Les phyla *Firmicutes* (*Streptococcus*), *Bacteroidetes* (*Prevotella*) et *Actinobacteria* (*Rothia*) sont aussi représentés.

L'important péristaltisme associé à l'intestin grêle est responsable de la diminution de la teneur en oxygène le long de ce compartiment et de sa disparition dans sa partie distale induisant ainsi des conditions d'anaérobiose. A l'inverse, le niveau de colonisation bactérienne augmente rapidement. Ainsi, on retrouve environ  $10^3$  à  $10^4$  colonies formant des unités (CFU) par gramme de contenu dans le duodénum, environ  $10^5$  à  $10^7$  dans le jéjunum et environ  $10^7$  à  $10^8$  dans l'iléon. Le microbiote résident associé au duodénum et au jéjunum est proche de celui de l'estomac.

Il est constitué de bactéries aérobies-anaérobies facultatives. Le genre *Streptococcus* est prédominant mais on retrouve également des lactobacilles et des entérocoques appartenant également au phylum *Firmicutes*. Des bactéries anaérobies strictes appartenant aux genres *Bacteroides* (phylum *Bacteroidetes*) et *Clostridium* (phylum *Firmicutes*) sont également

représentées (**Coudeyras and Forestier 2010**). Le microbiote associé à l'iléon est beaucoup plus diversifié et proche de celui du colon. Il est composé en majorité par des bactéries anaérobies strictes, largement représentées par les genres *Bacteroides* et *Clostridium*. D'autres genres bactériens sont retrouvés comme les bifidobactéries (phylum *Actinobacteria*), les lactobacilles, les entérobactéries (phylum *Proteobacteria*) et les entérocoques.

La population bactérienne la plus dense est retrouvée au niveau du colon ( $10^{10}$  à  $10^{12}$  CFU/g de contenu) qui est dépourvu d'oxygène. Elle représente 35 à 50% du volume du contenu du colon humain (**Cummings, Gibson and Macfarlane 1989**) et contient 70% des microorganismes du corps humain (**Whitman et al. 1998, Ley et al. 2006**). Le phylum *Bacteroidetes* est le plus souvent représenté par des espèces appartenant au sous-groupe *Bacteroidetes fragilis* comme par exemple *Bacteroidetes vulgatus*. Le phylum *Firmicutes* rassemble des bactéries appartenant aux genres *Clostridium*, *Eubacterium* et *Ruminococcus*. Ce phylum représente à lui seul une part importante du microbiote dominant (environ 2/3) et regroupe également des bactéries appartenant aux populations sous-dominantes. Par exemple, le groupe *Clostridium leptum* incluant l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* fait partie des populations dominantes et les bactéries anaérobies facultatives appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* appartiennent aux populations sous-dominantes. On retrouve également le phylum *Actinobacteria* avec notamment les genres *Bifidobacteria* et *Atopobium* et le phylum *Proteobacteria* avec les entérobactéries (*Escherichia coli*) (**Coudeyras and Forestier 2010**).

L'estimation du nombre d'espèces bactériennes contenues dans le microbiote intestinal est comprise entre 500 et 1000 selon les études (**Xu and Gordon 2003**). Cependant une analyse récente impliquant de nombreux sujets indique que le microbiote intestinal humain pourrait être composé de plus de 35000 espèces bactériennes (**Frank et al. 2007**). L'analyse de la composition du microbiote intestinal étant dépendante de la technique utilisée, ces résultats montrent qu'il pourrait exister un grand nombre de bactéries non identifiées peut-être à cause de leur faible proportion ou des difficultés liées aux prélèvements nécessaires aux analyses. En effet, l'accès à certaines zones du tractus gastro-intestinal reste délicat et peut parfois nécessiter des manipulations invasives comme les coloscopies ou les biopsies.

Cela explique pourquoi l'analyse de la composition du microbiote intestinal est souvent basée sur l'étude du microbiote fécal même si plusieurs études montrent qu'il existe des différences avec la composition du microbiote associé au colon (**Marteau et al. 2001, Zoetendal et al. 2002**). Cette différence est principalement liée à la proportion des bactéries aérobies-anaérobies facultatives qui sont pratiquement absentes des fèces par rapport au contenu

colique. Cependant la quantité de bactéries pour la plupart anaérobies strictes retrouvée dans les fèces, est similaire à celle retrouvée au niveau du colon (environ  $10^{11}$  CFU/g de contenu). Les genres les plus représentés sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* et *Propionobacterium*. Les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et les entérobactéries représentent des proportions plus faibles (**Coudeyras and Forestier 2010**).

## **II.4. ORIGINE ET DÉVELOPPEMENT DU MICROBIOTE** **INTESTINAL**

L'établissement du microbiote intestinal résulte de diverses séquences de colonisation bactérienne. Au moment de la naissance, le nouveau-né quitte un environnement stérile (utérus) et se retrouve exposé à de nombreuses bactéries provenant de sa mère (microbiotes vaginal, intestinal et cutané) et de son environnement immédiat (milieu hospitalier ou autre, personnel hospitalier, entourage...).

En effet, dès la rupture des membranes fœtales, les bactéries envahissent le nouveau-né et colonisent les surfaces en contact avec l'extérieur (**McLoughlin and Mills 2011**). Les bactéries sont détectables dans les fèces quelques heures après la naissance (**Del Chierico et al. 2012**). Le niveau de colonisation de l'intestin du nouveau-né est estimé à  $10^8$  à  $10^{11}$  UFC/g de fèces, 48 heures après sa naissance (**Gothfors 1980, Campeotto et al. 2007**).

Le tractus gastro-intestinal est d'abord colonisé par les bactéries aérobies et anaérobies facultatives. En consommant l'oxygène, ces bactéries, permettent la colonisation par des bactéries anaérobies strictes (**Vael and Desager 2009**).

En effet, des études indiquent qu'en général, les nouveaux-nés sont premièrement colonisés par des entérobactéries (*Escherichia coli*), des staphylocoques, des entérocoques (*Enterococcus faecalis*), des streptocoques et des lactobacilles qui semblent créer un environnement réduit favorable à l'établissement deux à trois jours après la naissance des bactéries appartenant à des genres comme *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* ainsi que les lactobacilles supportant mal l'oxygène (**Favier et al. 2002, Coudeyras and Forestier 2010**).

La composition du microbiote se diversifie en fonction de différents paramètres comme l'allaitement et se stabilise après la diversification du régime alimentaire. L'équivalent du microbiote adulte est atteint en moyenne à l'âge de deux ans (**Leclerc et al.**

2007). Une fois établie, la composition du microbiote est spécifique à l'hôte (**Zoetendal, Akkermans and De Vos 1998, Vanhoutte et al. 2004**) et relativement stable (**Seksik et al. 2003**) dans des conditions normales. Des études indiquent que le vieillissement entraîne un déclin des bifidobactéries en faveur des entérobactéries (**van Tongeren et al. 2005, Woodmansey 2007**) ainsi qu'une diminution des *Bacteroidetes* également (**Mariat et al. 2009**). Cette diminution des bifidobactéries peut avoir un impact sur la santé du sujet âgé car ces bactéries sont impliquées dans la stimulation du système immunitaire et dans les processus métaboliques, ce qui pourrait en partie expliquer les problèmes de malnutrition des sujets âgés (**Guigoz, Doré and Schiffrin 2008**).

L'établissement du microbiote intestinal est régulé par différents facteurs. Il implique des interactions hôte-bactéries déterminées par différents paramètres permettant la colonisation des surfaces épithéliales par certains microorganismes. Parmi ces paramètres, on retrouve les mécanismes qui permettent l'adhérence bactérienne aux surfaces, les facteurs permettant la survie des microorganismes dans l'environnement colonisé (pH, nutriments, oxygène) et l'interférence bactérienne qui permet une compétition entre les bactéries aboutissant ainsi à l'inhibition de l'une d'elles (**Guédiche 1990**). De ce fait, pour qu'une bactérie s'implante, il est nécessaire qu'elle trouve les facteurs appropriés au sein du tractus gastro-intestinal de l'hôte.

## **II.5. FACTEURS AGISSANT SUR LA COLONISATION BACTÉRIENNE**

La composition du microbiote intestinal est influencée par divers facteurs liés à l'hôte (terrain génétique, âge, état de santé), à la composition du régime alimentaire et aux circonstances environnementales (contamination par les pathogènes, antibiothérapies, chimiothérapie, climat, stress...). Le déroulement de la colonisation du tractus intestinal présente deux périodes critiques : la période comprise entre la naissance et la diversification du régime alimentaire et la période autour de cette diversification. En effet, le mode d'accouchement (voie basse *vs* césarienne), le mode d'alimentation du nouveau-né (allaitement *vs* formule infantile) l'environnement durant l'accouchement, les traitements antibiotiques et les conditions d'hygiène sont également des facteurs qui agissent sur la variabilité de la colonisation du microbiote intestinal (**Putignani et al. 2010**).

### **II.5.1. Influence du terrain génétique**

Malgré le fait que le nouveau-né se retrouve confronté à une multitude de microorganismes à la naissance, son tractus gastro-intestinal ne sera colonisé que par certaines bactéries capables d'interagir de façon symbiotique avec l'hôte. L'influence du terrain génétique sur la modulation de la colonisation bactérienne a été mise en évidence par l'observation de l'importante similarité entre des microbiotes provenant de jumeaux. Différentes études rapportent en effet que les similarités au niveau de la composition du microbiote intestinal sont liées au degré de similitude du terrain génétique (**Hoeksma and Winkler 1963, Van de Merwe, Stegeman and Hazenberg 1983, Stewart, Chadwick and Murray 2005, Zoetendal et al. 2001**).

### **II.5.2. Influence du terme de naissance**

Le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est moins diversifié et présente un retard d'implantation, notamment pour les espèces anaérobies strictes, comparé à celui des nouveau-nés à terme (**Campeotto et al. 2007**).

Ce retard peut s'expliquer par le fait que les enfants prématurés naissent souvent par césarienne et qu'ils nécessitent parfois une lourde prise en charge (soins intensifs, antibiotiques) associée à un environnement protégé qui les sépare de toute source de microorganismes. De plus, en fonction du terme de naissance, le mucus de l'intestin du nouveau-né présente des variations du degré de maturité (**Lorenz 2001**) ce qui peut moduler la colonisation bactérienne.

### **II.5.3. Influence du mode d'accouchement**

Le mode d'accouchement influence fortement les conditions de la colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. Des études rapportent que les enfants nés par césarienne présentent une composition du microbiote différente de celle des enfants nés par voie basse. De plus, la population bactérienne du microbiote intestinal des enfants nés par voie basse est semblable à celle du microbiote vaginal de leur mère tandis que le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne présente des similitudes avec le microbiote cutané de

la mère (**Huurre et al. 2008, Reid et al. 2011, Biasucci et al. 2010, Dominguez-Bello et al. 2010**). Les enfants nés par césarienne présentent en général un retard de colonisation par les lactobacilles, les bifidobactéries et les *Bacteroides* associé à une colonisation par des *Clostridium* plus rapide et plus intense par rapport aux enfants nés par voie basse.

#### **II.5.4. Influence de l'alimentation**

La composition chimique du régime alimentaire apparaît avoir un rôle déterminant pour la définition du microbiote intestinal du tractus gastro-intestinal immature (**Poroyko et al. 2011**). Chez les enfants nourris au sein, la population bactérienne est plus uniforme et plus stable que celle des enfants nourris avec des formules infantiles (**Le Huërou-Luron, Blat and Boudry 2010**). Un enfant né à terme et nourri au sein possède un microbiote intestinal au sein duquel les lactobacilles et les bifidobactéries prédominent par rapport à d'autres bactéries potentiellement pathogènes alors que des coliformes de *Bacteroides* et d'entérocoques prédominent chez les enfants nourris avec des formules infantiles (**deLaCochetière et al. 2007, Bezirtzoglou, Tsiotsias and Welling 2011**).

Par ailleurs, une étude publiée par Francavilla *et al.* en 2012, a évalué les effets du lactose sur la composition du microbiote intestinal. Cette étude a comparé des enfants allergiques au lait de vache ayant reçu un hydrolysate sans lactose pendant deux mois, puis les deux mois suivants, le même hydrolysate supplémenté en lactose. Les résultats révèlent que l'addition de lactose à une formule d'hydrolysats extensifs est capable de moduler la composition du microbiote intestinal en augmentant le taux de lactobacilles et de bifidobactéries et en diminuant le taux de *Bacteroides*, *Prevotella* et *Clostridium* (**Francavilla et al. 2012**).

La diversification du régime alimentaire étant une période critique, les caractéristiques des aliments consommés notamment leur teneur en bactéries et en nutriments, pourront influencer la variabilité du microbiote intestinal. Par exemple, le microbiote intestinal des individus végétariens ne semble pas contenir le groupe *Faecalibacterium prausnitzii* qui peut être associé à une consommation plus importante de viandes et de poissons (**Hayashi, Sakamoto and Benno 2002**).

D'autres études mettent en évidence l'influence de l'alimentation. Par exemple, il a été observé dans une étude que la restriction calorique progressive induisant une perte de poids

chez le sujet obèse est corrélée à une diminution du taux de bactéries du sous-groupe *Roseburia – Eubacterium rectale* sans affecter les taux de *Clostridium* ou de *Bacteroides* (**Duncan et al. 2007**). D'autre part, la consommation d'aliments dits fonctionnels du fait de leur contenu en probiotiques, prébiotiques ou en protéines bioactives (lactoferine) a également été décrite comme étant capable de modifier la composition du microbiote intestinal (**Prakash et al. 2011**).

### **II.5.5. Influence des traitements médicamenteux**

L'antibiothérapie est le principal facteur de risque associé à l'altération du microbiote intestinal. Le manque de spécificité attribué à certains antibiotiques peut être responsable de divers désordres notamment au niveau des différents microbiotes d'un organisme. Une étude a observé que les traitements à base d'antibiotiques réduisent la diversité du microbiote fécal des nouveau-nés et retardent la colonisation par des espèces, considérées comme ayant des effets bénéfiques, telles que les lactobacilles et les bifidobactéries. De plus, ces traitements durant les premiers mois de vie favorisent la colonisation par des pathogènes opportunistes résistant aux antibiotiques (**Bonnemaison et al. 2003**).

Une étude chez le rat a montré qu'un traitement à base d'amoxicilline durant la période du sevrage affecte la maturation de 10 à 30% des gènes impliqués dans la fonction de barrière intestinale, ces effets étant dus à l'altération du microbiote intestinal (**Schumann et al. 2005**). D'autres médicaments comme les anti-acides, les inhibiteurs des pompes à protons, ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent modifier l'environnement intestinal et donc perturber l'équilibre au sein du microbiote (**Huffnagle 2010**).

### **II.5.6. Influence des conditions d'hygiène**

L'établissement du microbiote intestinal dépend du degré d'exposition aux bactéries. Cela explique pourquoi en général, le processus d'établissement du microbiote intestinal est différent entre des enfants nés dans les pays émergents par rapport aux pays industrialisés.

Au cours des dernières décennies, la colonisation précoce par les entérobactéries semble avoir fortement diminué dans les pays industrialisés en faveur de la colonisation par les staphylocoques (**Adlerberth et al. 2006**). Les procédures strictes d'obstétrique et d'hygiène appliquées dans les maternités au moment de la naissance semblent être à l'origine

de la réduction de l'exposition aux microorganismes provenant de la mère et de l'environnement. Cela a pour conséquence de modifier le processus de colonisation du tractus gastro-intestinal du nouveau-né. On observe en effet dans ces pays un retard de la colonisation par des bactéries appartenant aux groupes *Bifidobacterium* ou *Bacteroides* (**Campeotto et al. 2007**) et aussi des bactéries des groupes *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Eubacteria* (**Bennet et al. 1991, Sepp et al. 1997**). D'autre part, des études indiquent que le développement du microbiote intestinal au sein d'une fratrie est responsable d'une augmentation des entérobactéries et des bifidobactéries dans le microbiote fécal (**Coudeyras and Forestier 2010**). Une étude réalisée chez le porc confirme que l'établissement et le développement d'un microbiote intestinal normal nécessitent une exposition continue à des microorganismes durant la période néonatale et que ce processus est altéré dans des conditions excessives d'hygiène. Dans cette étude, deux groupes d'animaux exposés à des microorganismes provenant de leur environnement propre durant les deux premiers jours de leur vie ont été transférés dans des isolateurs et la composition du microbiote intestinal a été évaluée à l'âge adulte.

Cette étude a révélé que le microbiote intestinal provenant des animaux élevés dans les conditions normales durant les deux premiers jours après la naissance présente une diversité plus importante par rapport à celui des animaux ayant été élevés dans des conditions d'hygiène contrôlées. De plus les séquences correspondant à l'établissement du microbiote intestinal normal sont perturbées dans les conditions d'hygiène contrôlées (**Schmidt et al. 2011**).

Ces différents facteurs influencent la composition du microbiote intestinal mais on peut noter que le microbiote intestinal est résilient. Cela signifie que malgré l'apparition de déséquilibres, la composition du microbiote intestinal tend à retrouver son état d'origine. Ces observations suggèrent l'existence d'une communication régulière entre le microbiote et son hôte.

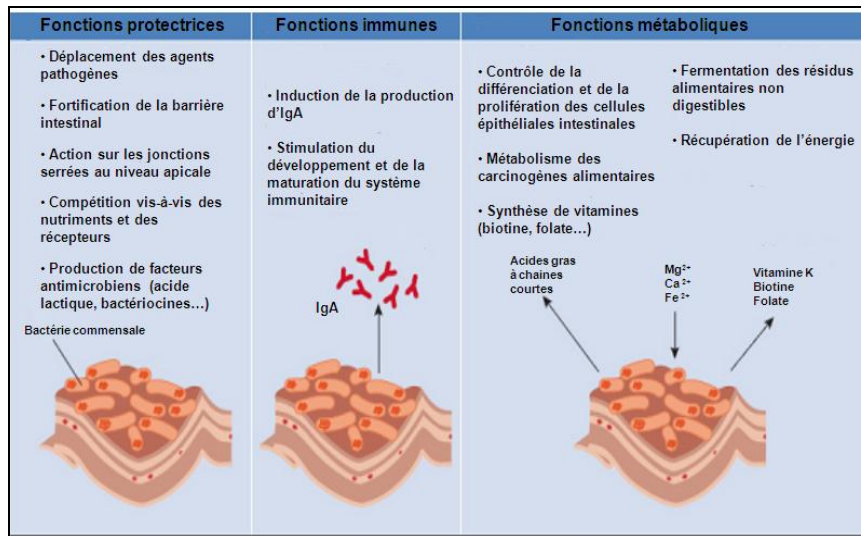
## **II.6. FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL**

Les bactéries du microbiote sont impliquées dans diverses fonctions bénéfiques à l'hôte, comme la prévention des infections causées par les pathogènes, la digestion et la mise



à disposition de nutriments ainsi que la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses (**Figure 19**).

Ce microbiote impliqué dans des fonctions nutritive, métabolique, protectrice et immunologique agit sur la physiologie intestinale mais aussi sur la physiologie systémique de l'hôte (**Fanaro et al. 2003**). Les fonctions métabolique et protectrice seront présentées de façon succincte et la fonction immunologique sera décrite de façon plus détaillée.



**Figure 19: Les fonctions du microbiote intestinal**

D'après (O'Hara and Shanahan 2006)

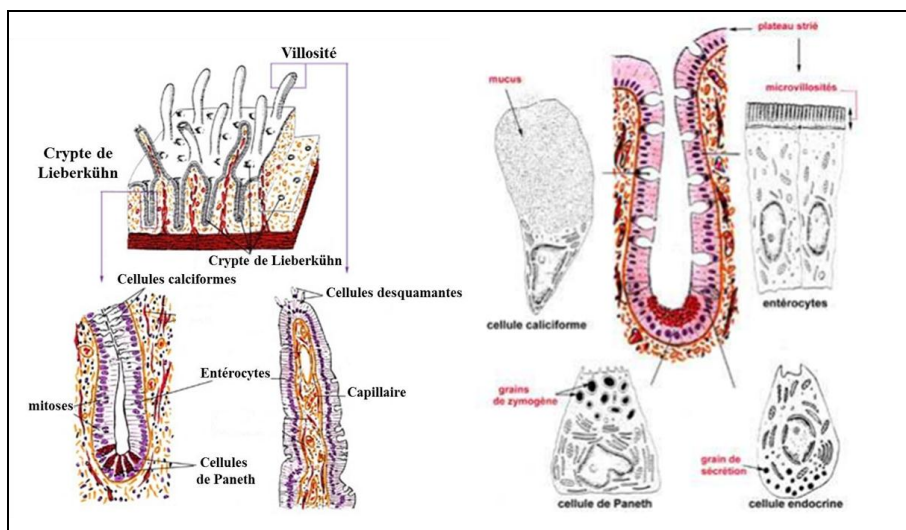
### **II.6.1. Fonctions métabolique et nutritionnelle**

Les bactéries du microbiote intestinal peuvent participer au métabolisme de l'hôte en consommant des éléments non digérés par l'hôte comme les carbohydrates (pectine, cellulose...), fournissant ainsi des nutriments à l'hôte ou à d'autres bactéries du microbiote. L'activité métabolique la plus intense se retrouve au niveau du colon qui contient le plus grand nombre de bactéries. Le microbiote intestinal participe au métabolisme des sucres, des lipides et des protéines. De plus, il est impliqué dans le maintien de l'homéostasie des gaz au niveau de l'intestin. Les principaux métabolites fournis par le métabolisme bactérien (butyrate, acétate et propionate) sont ensuite pris en charge par les cellules de l'hôte. Ces acides gras à chaînes courtes jouent un rôle important dans la physiologie de l'intestin, en contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales au niveau du colon (**Srikanth and McCormick 2008**), notamment le butyrate qui est consommé en grande partie

par les colonocytes. Ce microbiote apporte également des acides aminés indispensables à l'hôte et des vitamines comme la vitamine K et des vitamines du type B (folate, biotine, riboflavine...) (**Hill 1997**). Les bactéries de ce microbiote participent également à la détoxification de l'organisme et au métabolisme des xénobiotiques.

## **II.6.2. Fonction protectrice**

Les bactéries du microbiote intestinal s'opposent à la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries de l'environnement externe pouvant être potentiellement pathogènes. De plus, elles permettent également de contrôler le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées au sein du microbiote intestinal. Cette fonction protectrice des bactéries commensales du microbiote intestinal est essentiellement due à la compétition pour les nutriments mais aussi à l'exclusion compétitive pour l'occupation des sites d'adhérence épithéliaux (**Srikanth and McCormick 2008**). La protection de l'intégrité de l'hôte comprend également la production de composés antimicrobiens par les bactéries du microbiote intestinal comme les bactériocines capables de détruire des bactéries pathogènes. De plus, la présence du microbiote intestinal régule la composition du mucus qui recouvre et protège la muqueuse intestinale. Ce mucus contient principalement des mucines qui servent de barrière physique entre l'épithélium intestinal et les bactéries (**Swidsinski et al. 2007**) mais aussi des agents antibactériens (lysosymes, sIgA et défensines) produits par les cellules épithéliales. Il existe différents types de cellules épithéliales. La muqueuse intestinale comporte des invaginations, appelées cryptes de Lieberkühn, où sont situées les cellules souches dont la différenciation et la prolifération sont à l'origine du renouvellement de l'épithélium intestinal (**Figure 20**). Les cellules de Paneth situées au fond des cryptes, produisent des lysosymes et des défensines. De ce fait, elles participent activement à l'immunité innée. Les cellules calciformes produisent le mucus, les cellules entéro-endocrines produisent des hormones (catécholamines) et les entérocytes absorbants ont pour fonction d'absorber les nutriments. Le microbiote intestinal peut moduler la teneur en mucines du mucus en stimulant la différenciation des cellules calciformes. Il peut également influencer le niveau de production et de sécrétion des mucines (**Deplancke and Gaskins 2001**). Le microbiote intestinal peut donc réguler l'expression des gènes des cellules intestinales de l'hôte.



**Figure 20: Les cellules de l'épithélium intestinal**

Disponible sur : <http://romius.free.fr/histologie/cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/>

Les effets induits regroupent l'augmentation de la prolifération des cellules intestinales, de l'absorption et du métabolisme des nutriments, de l'assimilation de certains ions (fer, magnésium et calcium) et l'amélioration de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (Hooper et al. 2001, Rawls, Samuel and Gordon 2004) également assuré par la présence de jonctions serrées. En effet, l'absence de microbiote est associée à une diminution du renouvellement cellulaire, de la vascularisation au niveau de l'épithélium intestinal et de l'activité des enzymes digestives.

Cette absence a également un effet majeur sur le système immunitaire puisqu'un défaut de cellules immunitaires est également observé (Macdonald and Monteleone 2005).

### **II.6.3. Fonction immunologique**

Le développement de l'immunité du nouveau-né est stimulé par la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal qui est dépourvu de germe *in-utero*. Cette colonisation intervient dans le développement de l'immunité innée et adaptative.

Des résultats suggèrent que cette relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est spécifique à l'hôte et aussi à l'espèce. Une étude récente montre en effet que l'influence du microbiote intestinal sur la maturation du système immunitaire de l'hôte est dépendante de la spécificité hôte-microbiote. Dans cette étude, des souris axéniques (sans microbiote) ont été colonisées par un microbiote de souris, de rat ou d'humain. L'analyse des

cellules du système immunitaire a révélé que les souris colonisées par les microbiotes provenant de rat et d'humain présentent certaines caractéristiques des souris axéniques c'est-à-dire que leur système immunitaire semble être peu développé. De plus les souris axéniques colonisées par un microbiote de souris sont mieux protégées contre les infections comparées aux souris colonisées avec un microbiote humain (**Chung et al. 2012**).

### **II.6.3.1. Immunité anté-natale**

Les données regroupées dans la revue de Langhendries *et al.*, indiquent que durant la grossesse, le système immunitaire de la mère et celui du fœtus doivent assurer un état de tolérance maintenu par la sécrétion de cytokines de type Th2 par le compartiment foeto-placentaire. Cet état immunitaire permet à la mère d'accepter le fœtus dont le matériel génétique contient une moitié d'origine paternelle. Les réponses de types Th1 sont révélatrices d'un état anormal et peuvent entraîner un avortement, c'est pourquoi elles doivent être totalement inhibées. La grossesse chez l'humain est en effet associée à une augmentation d'IL-4 et d'IL-13 mais aussi de cytokines régulatrices comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (**Langhendries et al. 2010**). Le développement des fonctions immunes se fait progressivement durant la vie intra-utérine. Une étude rapporte que le terrain immunitaire *in-utero* est largement en faveur de l'acquisition de la tolérance grâce à la production de lymphocytes T régulateurs natifs d'origine thymique (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>) par le fœtus, lui permettant de reconnaître ses propres cellules mais aussi de tolérer les cellules maternelles mises en présence *via* le placenta. Ce terrain immunitaire de type humoral est renforcé par le passage des immunoglobulines maternelles durant les derniers mois de grossesse afin d'assurer une protection passive dès la naissance du nouveau-né (**Langhendries et al. 2010**).

### **II.6.3.2. Immunité post-natale**

Le rôle fondamental de la colonisation bactérienne dans la maturation du système immunitaire associé à l'intestin (GALT) a été mis en évidence chez les animaux axéniques et gnotoxéniques. Ceci souligne l'intérêt de la gnotobiologie qui désigne la colonisation d'un animal axénique avec un microbiote intestinal sélectionné. Les animaux sont dits mono-associés (mono-colonisés, monoxéniques) ou bi-associés dans le cas où ils sont inoculés par une ou deux souches bactériennes seulement. Ces modèles peuvent apporter des informations sur les propriétés intrinsèques de la bactérie par rapport à ses relations avec l'hôte en absence

de compétition chez les animaux mono-associés alors que chez les animaux bi-associés, les renseignements apportés s'intéressent aussi aux interactions bactérie-bactérie.

Différentes études ont observé que les animaux axéniques présentent un nombre réduit de plaques de Peyer associé à un développement inachevé. En effet, les plaques de Peyer retrouvées chez ces animaux contiennent moins de cellules M et de lymphocytes (**Yamanaka et al. 2003**). D'autre part, la *lamina propria* des animaux axéniques a été décrite comme moins riche en lymphocytes T et en plasmocytes producteurs d'IgA (**Macpherson and Harris 2004**) et les populations de lymphocytes intraépithéliaux (LT $\gamma\delta$ ) comme inactives (**Lefrancois and Goodman 1989**). De plus, l'état axénique induit une diminution du taux de LT CD4<sup>+</sup> au niveau de la rate et des ganglions mésentériques, ce qui illustre la participation du microbiote intestinal dans le développement du système immunitaire dans son ensemble (**Mazmanian et al. 2005, Hrcir et al. 2008**). Par conséquent, les animaux axéniques présentent des réponses humorales systémiques non spécifiques plus faibles que les souris conventionnelles. On observe en effet, une forte réduction des taux d'IgA et d'IgG sériques chez les animaux axéniques. De plus, même s'ils produisent une forte quantité d'IgG spécifiques en réponse à un antigène, on observe chez ces animaux une faible production d'IgG non spécifiques (**Macpherson and Harris 2004**).

L'apport d'un microbiote normal à des animaux axéniques permet de retrouver un état proche de la normalité au niveau de la densité cellulaire (**Bry et al. 1996**).

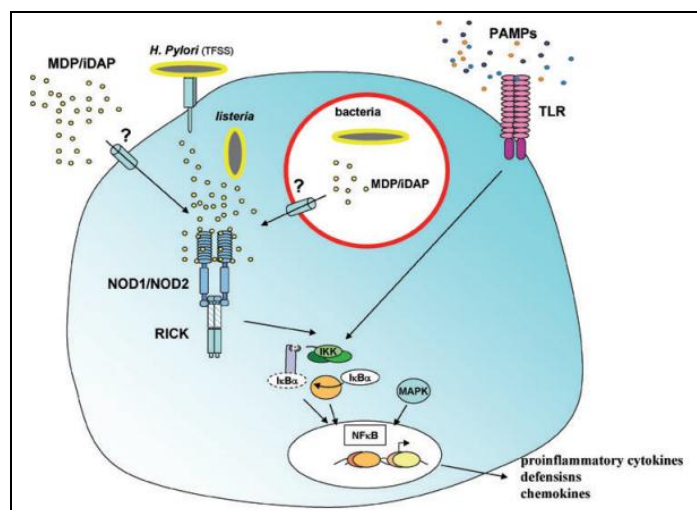
### **II.6.3.3. Interactions hôte-microbiote et stimulation de l'immunité innée**

Le système immunitaire intestinal est capable de bloquer la pénétration des bactéries du microbiote intestinal sans l'intervention de réponses exagérées au niveau local et sans l'intervention de réponses systémiques. Ces caractéristiques impliquent le microbiote intestinal dans le développement de processus participant à l'inhibition du développement de réponses immunes inappropriées. On peut citer l'exemple des macrophages intestinaux qui peuvent phagocyter les bactéries qui franchissent la barrière épithéliale sans produire des signaux augmentant la réponse inflammatoire (**Schenk et al. 2005**). D'autre part, la migration des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques) ayant pris en charge des bactéries au niveau des plaques de Peyer s'arrête au niveau des ganglions mésentériques et les lymphocytes activées par ces cellules ne sortent pas du GALT (**Macpherson, Geuking and McCoy 2005**). De même, les cellules dendritiques situées au niveau de la *lamina propria*

détectent les bactéries au niveau de la lumière intestinale grâce à l'émission de dendrites sans altération de la barrière intestinale.

La muqueuse intestinale en contact permanent avec les antigènes microbiens et alimentaires sert de barrière entre l'hôte et le milieu extérieur. La relation symbiotique unique entre les bactéries du microbiote intestinal et l'hôte passe également par l'interaction entre des motifs microbiens très conservés (Microbe-Associated Molecular Pattern : MAMP) et des récepteurs spécifiques (Pattern Recognition Receptors : PRR) retrouvés au niveau des cellules intestinales et également au niveau des cellules du système immunitaire de l'hôte (immunité innée). Les deux principaux types de PRR permettant la reconnaissance des motifs antigéniques de microorganismes sont les récepteurs Toll-Like (Toll Like Receptors : TLR) et les récepteurs de type NOD (Nucleotid Oligodimerization Domain-like receptor : NLR).

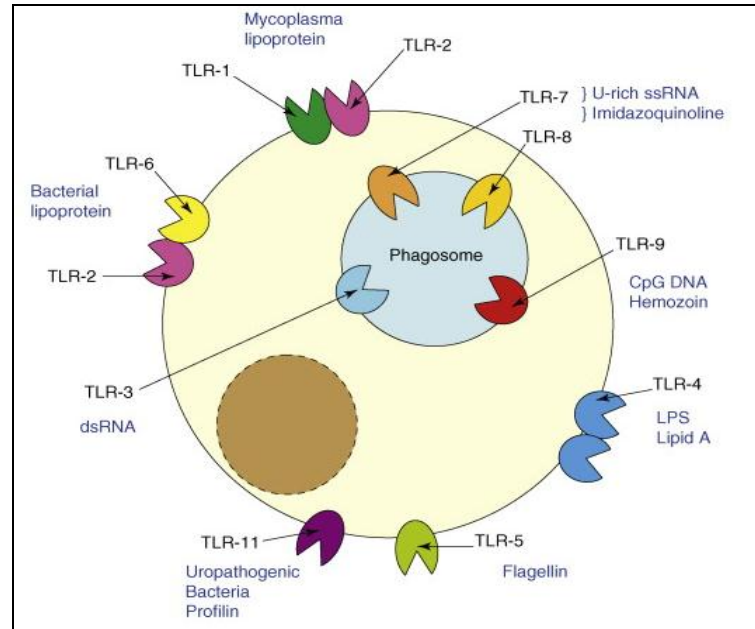
La famille des NLR contient deux types de récepteurs (Nod1 et Nod2) localisés au niveau cytosolique. Ces récepteurs peuvent reconnaître des composants du peptidoglycane (élément de la paroi bactérienne). Le récepteur Nod 1 reconnaît l'acide meso-diaminopimélique et le récepteur Nod 2 reconnaît le muramyl dipeptide (**Franchi et al. 2008**) (**Figure 21**). La transduction du signal déclenché par la liaison de leurs ligands induit une activation d'un facteur de transcription de la réponse inflammatoire (nuclear factor kappa B : NF- $\kappa$ B) aboutissant à la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires (**McDonald, Inohara and Nuñez 2005**).



**Figure 21: Modèle de l'activation des voies de signalisations des récepteurs Nod1 et Nod2**

Extrait de (**Franchi et al. 2008**)

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires qui peuvent être exprimés à la surface des cellules ou au niveau intracellulaire sur la membrane des endosomes en fonction de la nature de leurs ligands (**Figure 22**).

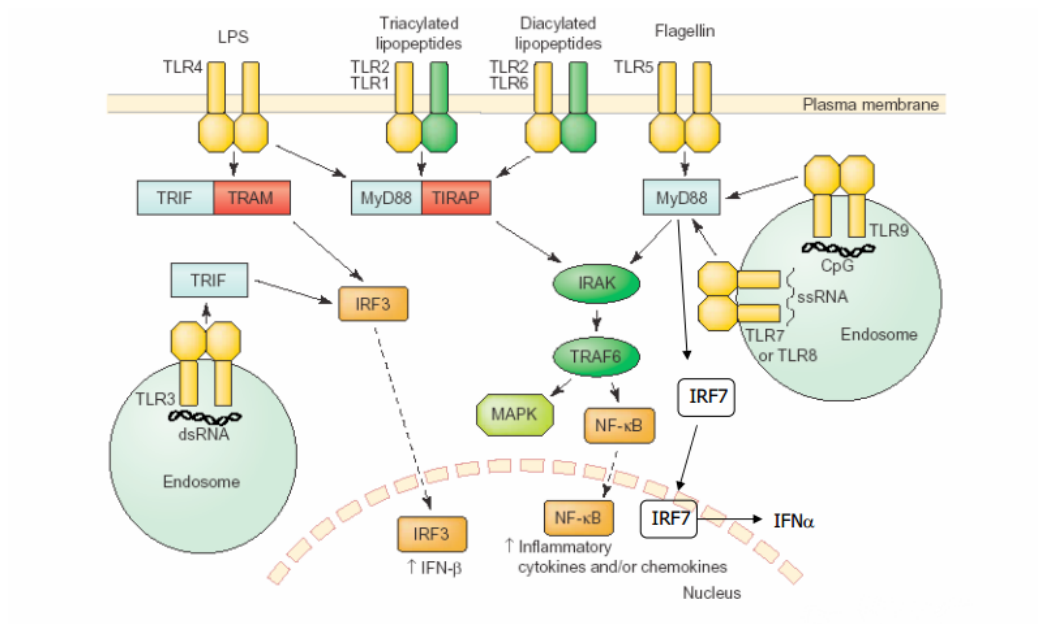


**Figure 22: Schéma des TLRs et leurs ligands**

Extrait de (Reed et al. 2009)

Plusieurs types de TLR ont été caractérisés chez les mammifères (10 chez l'homme et 11 chez la souris), identifiés chacun par un numéro (TLR 1, TLR 2...). Les TLR 1 à 9 sont conservés chez la souris et l'homme. Cependant le TLR 10 n'est fonctionnel que chez l'homme, de plus son ligand n'a pas encore été déterminé. On peut également noter que la présence des TLR 12 et 13 a été identifiée chez la souris cependant que leur rôle est encore inconnu (Akira 2003). Le TLR 1 est impliqué dans la reconnaissance des triacyls (lipoprotéines), le TLR 2, dans la reconnaissance des lipoprotéines, des lipopeptides, du peptidoglycane ou encore des acides lipoteichoïques et le TLR 3, dans la reconnaissance de l'ARN double brin des virus. Le TLR 4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) qui est l'élément principal de la membrane des bactéries à Gram négatif. Le TLR 5 est spécifique de la flagelline. Les TLR 7 et 8 sont chargés de la reconnaissance de l'ARN simple brin viral. Le TLR 9 reconnaît les motifs Cytosine-phosphate-Guanosine (CpG) de l'ADN. L'activation de ces récepteurs déclenche la transcription de gène de cytokines *via* le facteur de transcription NF- $\kappa$ B en collaboration avec des facteurs de transcription IRF (Interferon Regulatory Factor) grâce au recrutement de l'adaptateur moléculaire MyD88 (myeloid differentiation primary

response gene 88) ou d'autres adaptateurs contenant des domaines TIR (Toll/Interleukine-1 Receptor) et dirigeant des voies indépendantes de MyD88 (**Figure 23**). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-12 sont produites par l'activation de NF- $\kappa$ B. Alors que l'activation de facteurs de transcription appartenant à la famille des IRF (Interferon Regulatory Factor) induit la production d'IFN de type 1 (**Lai and Gallo 2008**) qui sont chez l'homme les IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\omega$  (**Liu 2005**).



**Figure 23: Représentation des voies de signalisation associées aux récepteurs Toll Like**

Extrait de (van Duin, Medzhitov and Shaw 2006)

Ces TLR, qui ont pour fonction de transmettre des signaux de défense contre les pathogènes, se retrouvent dans un environnement particulier au niveau intestinal car la prise en charge des microorganismes qu'ils renferment représente un défi du fait de leur abondance. La relation symbiotique unique qui existe entre les bactéries du microbiote intestinal et l'hôte est illustrée par le fait que l'activation des TLR par les bactéries commensales au niveau intestinal n'induit pas de réponse inflammatoire excessive mais apporte au contraire des effets protecteurs de l'homéostasie de l'hôte (**McLoughlin and Mills 2011**). L'activation de ces récepteurs par ces bactéries peut induire des facteurs de croissance et des cytokines exerçant des effets cytoprotecteurs et réparateurs sur les cellules épithéliales intestinales (IEC : Intestinal Epithelial Cells) (**Rakoff-Nahoum et al. 2004**). De plus, ces cellules présentent une faible expression du TLR 4 moins réactif au LPS au niveau du colon qui présente la population bactérienne la plus importante. Cela leur permet de tolérer les bactéries retrouvées



dans le compartiment luminal. On peut citer un autre aspect qui concerne la localisation cellulaire des TLR qui orientent la nature de la réponse immunitaire. Les TLR 5 par exemple, sont exprimés au niveau basolatérale des cellules épithéliales, ainsi les bactéries qu'ils rencontrent doivent nécessairement avoir franchi la barrière épithéliale et de ce fait peuvent être considérées comme des pathogènes (**Abreu, Fukata and Arditi 2005**).

# III. CONTEXTE DU SUJET DE THÈSE : MICROBIOTE INTESTINAL ET ALLERGIE

---

## III.1. MICROBIOTE INTESTINAL ET PATHOLOGIES

Dans certaines conditions décrites précédemment, des modifications de ce microbiote peuvent induire un état de dysbiose caractérisé par un déséquilibre de la composition comprenant des bactéries commensales bénéfiques (symbiotes), les bactéries pathogènes et les bactéries commensales ayant la capacité d'induire une inflammation excessive dans certaines conditions (pathobiontes) (McLoughlin and Mills 2011).

Chez l'homme, les dysbioses ont été impliquées dans de nombreux états pathologiques apparaissant au niveau du tractus digestif mais également au niveau d'autres organes. Ces pathologies comprennent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI, maladie de Crohn et recto-colite ulcéro-hémorragique), mais aussi des pathologies comme l'obésité, le diabète, les fibromyalgies et les allergies.

## III.2. RELATIONS ENTRE MICROBIOTE INTESTINAL ET ALLERGIES ALIMENTAIRES

### III.2.1. Microbiote intestinal et maladies allergiques

La relation entre le microbiote intestinal et le développement de maladies allergiques est évoquée dans la « *microflora hypothesis* » qui suggère qu'elle provient de la capacité du microbiote à moduler les réponses immunitaires au niveau intestinal dans les périodes précoces du développement ce qui peut directement affecter le développement de la réaction allergique et pourrait donc en partie expliquer l'émergence de maladies allergiques dans les pays industrialisés. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent que les altérations du microbiote apparaissent avant les manifestations allergiques chez l'enfant et que les dysbioses ne sont donc pas uniquement une conséquence mais également une cause de l'apparition de maladies allergiques (Vael et al. 2011, Nakayama et al. 2011). Les résultats d'une étude danoise portant sur 411 enfants ont ainsi révélé que la diminution de la diversité des bactéries

du microbiote intestinal durant les périodes précoces du développement (entre un mois et un an) est associée à une augmentation du risque de sensibilisation allergique et de rhinites allergiques durant les six premières années de vie (**Bisgaard et al. 2011**). Penders *et al.* ont proposé une synthèse des travaux s'intéressant aux relations entre l'allergie et la composition du microbiote intestinal. Il en ressort de façon générale que les enfants allergiques présentent un microbiote intestinal moins riche en bifidobactéries et en lactobacilles (**Penders et al. 2007**). Parmi les données de la littérature, on retrouve également des études qui observent une diminution des bifidobactéries et une augmentation des espèces *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans le microbiote de patients allergiques (**Vael et al. 2008, Watanabe et al. 2003**). Des études basées sur des méthodes de culture indiquent que les taux de bifidobactéries et d'entérocoques peuvent être corrélés aux manifestations cliniques de l'allergie durant le premier mois de vie. Cependant, à partir de l'âge de 6 mois le niveau des entérocoques redevient similaire à celui observé chez des enfants sains (**Björkstén et al. 2001**). De plus, le ratio *Bacteroidetes/Bifidobacterium* a été décrit comme plus élevé chez les enfants âgés de 2 ans montrant des symptômes d'atopie (**Suzuki et al. 2004**). Une autre étude, basée cette fois sur une méthode indépendante de la culture (qPCR), observe que les enfants qui développent des allergies sont moins fréquemment colonisés par les espèces provenant des genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Clostridium difficile* à l'âge de 2 mois comparés aux enfants vivant au sein de grands habitats qui présentent par ailleurs un microbiote plus diversifié (**Sjögren et al. 2009**). Les bactéries du genre *Clostridium* semblent être associées à la protection contre la respiration sifflante durant la première année de vie (**Verhulst et al. 2008**). L'étude de Thompson-Chagoyan et al. rapporte l'observation de dysbioses au sein du microbiote intestinal d'enfants souffrant d'une allergie alimentaire (lait de vache) par rapport à des enfants non allergiques (**Thompson-Chagoyan et al. 2010**).

Par ailleurs, l'hypothèse des « old friend » suggérée par Rook *et al.* en 2005, prend en compte les bactéries commensales du microbiote mais aussi certains microorganismes pathogènes relativement inoffensifs comme les mycobactéries saprophytes et les helminthes. Il semblerait que ces « old friend » n'induisent pas de réponses immunitaires dangereuses pour l'hôte, mais au contraire, exerceraient des propriétés immunorégulatrices au niveau du système immunitaire intestinal (**Rook and Brunet 2005**). Par exemple, une étude chez la souris a analysé l'impact des infections helminthiques sur le développement d'une allergie alimentaire. Les souris infectées et non infectées ont été sensibilisées par voie orale *via* l'administration d'un extrait d'arachide en présence ou en absence d'adjuvant (toxine cholérique). L'analyse de la réponse allergique effectuée après un challenge oral avec un

extrait d'arachide a révélé que la production d'IgE spécifiques de l'allergène et les manifestations cliniques sont moins intenses chez les souris infectées et sensibilisées en présence d'adjuvant par rapport aux souris non infectées. L'administration d'anticorps neutralisant l'IL-10 aux souris infectées et sensibilisées a permis d'établir que les effets protecteurs apportés par les helminthes sont dus à l'induction de mécanismes régulateurs qui inhibent la production d'IgE spécifiques de l'allergène car la production d'IgE ainsi que les manifestations cliniques chez ces souris étaient alors similaires aux souris non infectées (**Bashir et al. 2002**).

### **III.2.2. Données expérimentales sur l'influence du microbiote intestinal dans le développement de l'allergie et l'acquisition de la tolérance aux aliments**

Le développement de l'allergie alimentaire est dû à une rupture de la tolérance aux antigènes alimentaires chez les individus atopiques, caractérisés par une prédisposition génétique au développement de réponses de type Th2. Des études montrent que l'établissement du microbiote intestinal serait nécessaire à l'acquisition de la tolérance alimentaire (tolérance orale) définie comme une absence de réaction systémique à des antigènes précédemment ingérés, quand ils sont rencontrés dans les voies parentérales (**Strobel and Mowat 1998**).

L'équipe de Sudo a effectué une étude afin de mieux comprendre le rôle du microbiote intestinal dans l'induction de la tolérance orale. Dans cette étude, des souris BALB/c SPF et axéniques ont été sensibilisées ou tolérisées à l'ovalbumine. L'analyse des échantillons sanguins prélevés au cours de l'étude a révélé que chez les souris SPF, la tolérance orale induit une diminution des réponses de types Th1 (IgG2a) et Th2 (IgE et IgG1) alors que chez les souris axéniques, seules les réponses de types Th1 sont diminuées tandis que les réponses de type Th2 sont maintenues. La diminution de l'activité cellulaire de type Th2 apparait donc comme un facteur favorisant l'acquisition de la tolérance orale chez la souris.

D'autres résultats de cette étude illustrent l'importance du moment de l'établissement du microbiote intestinal. En effet, la colonisation des souris axéniques par *Bifidobacterium infantis* durant la période néonatale permet l'acquisition de la tolérance orale alors que l'implantation tardive de cette souche (à l'adolescence) ne permet pas de modifier les réponses qui restent aussi fortes que celles observées chez les souris axéniques (**Sudo et al.**

1997). Toutefois, il faut noter que des études réalisées chez la souris axénique indiquent que la tolérance orale peut être induite chez ces souris mais qu'elle persiste moins longtemps par rapport aux souris conventionnelles (**Moreau and Corthier 1988, Moreau and Gaboriau-Routhiau 1996**). D'autres études indiquent aussi qu'il n'y a pas de différence entre les souris axéniques et conventionnelles concernant l'induction de cette tolérance (**Furrie, Turner and Strobel 1995, Repa et al. 2008**). Il est néanmoins généralement admis que l'impact du microbiote intestinal sur le développement du GALT durant la période néonatale joue un rôle important dans l'induction de la tolérance orale. En effet, la pression exercée par les bactéries du microbiote intestinal durant la période néonatale va permettre l'acquisition progressive de la tolérance aux bactéries commensales. Par ailleurs, l'instauration d'un environnement tolérogène permet l'acquisition de la tolérance aux antigènes alimentaires.

La stimulation par les protéines alimentaires durant la période du sevrage joue également un rôle important dans la maturation du système immunitaire au niveau local et systémique (**Menezes et al. 2003**). La mémorisation de cette tolérance semble être une étape-clé de la stabilisation de l'immunité ultérieure. Ainsi, l'inadéquation de la mise en place de cet équilibre pourra être à l'origine de désordres immunitaires de type allergique ou auto-immunitaire (**Langhendries et al. 2010**).

Le rôle important des cellules Treg a été démontré pour l'établissement de la tolérance orale (**Jyonouchi 2008**). La présence du microbiote a également été décrite comme étant nécessaire pour le développement de cellules Treg fonctionnelles (**Ostman et al. 2006, Hrnčir et al. 2008, Ishikawa et al. 2008, Strauch et al. 2005**). Des études ont observé que des espèces de *Clostridium* indigènes (retrouvées au niveau du microbiote intestinal) jouent un rôle important dans l'induction de Treg (**Atarashi et al. 2011, Nagano, Itoh and Honda 2012, Lathrop et al. 2011**). Cependant des données de la littérature contredisent certains résultats et indiquent que les antigènes du microbiote intestinal n'auraient aucun rôle dans l'hétérogénéité et la fonctionnalité des Treg (**Min et al. 2007**). De plus, il existe des études qui retrouvent des taux de Treg similaires voire plus élevés chez les souris axéniques par rapport aux souris conventionnelles (**Geuking et al. 2011, Lathrop et al. 2011**).

La composition du microbiote intestinal a récemment été décrite comme pouvant moduler le phénotype et la fonctionnalité des cellules iNKT chez la souris (**Wingender et al. 2012**). D'autres études indiquent que les bactéries du microbiote intestinal ont un effet sur le développement des cellules Th17. Des études chez les souris axéniques indiquent que ces souris présentent une diminution significative des cellules Th17. Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB : Segmented filamented bacteria) ont d'ailleurs été identifiées comme étant

fortement inductrices de la différenciation vers le profil Th17 au niveau de l'intestin chez les souris (**Ivanov et al. 2009, Gaboriau-Routhiau et al. 2009**). D'autres études chez la souris axénique indiquent que le microbiote intestinal est aussi impliqué dans la régulation des fonctions tolérogéniques des cellules dendritiques (**Niess and Adler 2010, Cong et al. 2009**). En effet, les cellules dendritiques situées au niveau de la lamina propria peuvent réagir à l'activation des TLR en augmentant la production d'IL-10. De plus, ces voies de signalisation sont importantes pour la modulation des réponses des cellules régulatrices au niveau intestinal. Différents récepteurs, notamment les TLR 2, TLR 4 et TLR 9 paraissent jouer un rôle déterminant dans l'orientation vers la tolérance (**Langhendries et al. 2010**).

Par exemple, le LPS (ligand du TLR 4) peut induire l'expression des Treg au niveau de la *lamina propria* (**Shirai et al. 2004**). Des études chez l'animal axénique ont d'ailleurs montré que l'administration de LPS leur permet de développer une tolérance orale contre un antigène alimentaire (**Wannemuehler et al. 1982**). De plus, une étude a montré que les souris déficientes en TLR 4 (TLR 4<sup>-</sup>) ou soumises à un traitement antibiotique, développent des réponses allergiques plus fortes que les souris conventionnelles contrôles. De plus, l'activation des TLR 9 par l'administration de CpG aux souris TLR 4<sup>-</sup> durant la sensibilisation a diminué les manifestations allergiques et les réponses de type Th2 *via* l'induction de réponses contre-régulatrices de type Th1. (**Bashir et al. 2004**).

D'autre part des études sur des modèles animaux d'allergie au lait de vache rapportent également des différences de réponses en relation avec le microbiote intestinal. Une étude réalisée au laboratoire a évalué les réponses à la sensibilisation à la BLG chez des souris BALB/c axéniques, SPF et SOPF (specific and opportunistic pathogen free). Les résultats ont montré que la réponse immunitaire diffère parmi tous les lots de souris pourtant sensibilisées dans les mêmes conditions par une administration de BLG en présence d'un adjuvant, par voie intra-péritonéale. Chez les souris axéniques, les taux d'IgE et d'IgG1 sériques étaient significativement plus importants durant la réponse primaire et les taux d'IgE persistaient plus longtemps (**Hazebrouck et al. 2009b**). Une autre étude montre que les souris axéniques développent de façon plus intense des allergies au lait de vache médiées par les IgE. Dans cette étude les souris axéniques comparées aux souris conventionnelles apparaissent comme étant plus réactives à la sensibilisation orale avec l'observation d'une augmentation de la sécrétion d'IL-4 par les spénocytes réactivées *ex-vivo*. De plus, ces souris présentent des manifestations allergiques (réduction de la température corporelle) plus intenses après un challenge oral, associées à des taux plus importants de protéases mastocytaires de type 1

(mouse Mast Cell Protease 1 : mMCP1), un marqueur plasmatique de dégranulation des mastocytes et d'IgG1 spécifiques de la BLG (**Rodriguez et al. 2011**).

### **III.3. MODÈLES EXPERIMENTAUX**

Les différentes études associant le microbiote intestinal et les allergies alimentaires illustrent le potentiel des modèles expérimentaux dans la caractérisation des mécanismes associés au développement de l'allergie alimentaire ou à l'induction de la tolérance orale. Ces modèles permettent en effet, de trouver des pistes qui permettront peut-être d'identifier précisément des bactéries pouvant être utilisées pour leur effets protecteurs indiscutables ou encore des indications concernant les possibilités de modulation du microbiote intestinal en fonction de l'hôte afin qu'il induise des effets bénéfiques qui arrivent à réverser certains mécanismes pathologiques.

#### **III.3.1. Méthodes d'études du microbiote intestinal**

Nous avons vu précédemment que le terme axénique est utilisé pour décrire un animal dépourvu de germe avec quelques exemples d'études où ils ont été impliqués.

Les animaux axéniques sont obtenus grâce à des techniques de césarienne aseptique ou le plus souvent maintenant, des techniques de décontamination à la naissance du nouveau-né obtenu par voie basse. Ces animaux sont élevés dans des enceintes complètement stériles appelés isolateurs. Ils se nourrissent d'aliments stériles et respirent un air stérile (**Ducluzeau and Raibaud 1989**).

L'article de Robert Kirk propose un historique de la génération de ces animaux en tant qu'outil expérimental (**Kirk 2012**). Cette idée a été proposée pour répondre au débat entre Emile Duclaux et Louis Pasteur sur la nature préjudiciable des microbes ou leur nécessité pour la vie des organismes supérieurs comme le croyait Pasteur. Bien que cette idée ait été émise dans les années 20, les efforts mis en jeu pour créer et maintenir des organismes dans des conditions stériles n'ont aboutit qu'à partir des années 40, grâce à Reyniers et Trexler qui ont été les premiers à perfectionner la production en routine des animaux axéniques en les maintenant avec succès sur plusieurs générations. Reynier créa en 1940 un isolateur en acier capable de fournir un environnement stérile pour la production et l'entretien d'animaux axéniques (**Reyniers 1959**). Par la suite, Trexler développa en 1957 un prototype (appareil en

film flexible) pour l'élevage et l'utilisation des animaux axéniques, basé sur des principes de simplicité, d'économie et d'adaptabilité ainsi que sur l'utilisation du plastique à la place de l'acier (**Trexler and Reynolds 1957**). L'expansion des élevages axéniques est due en grande partie au développement des isolateurs de Trexler. En effet, ces isolateurs en matière plastique souple couramment utilisés sont autoclavables et maintenues en surpression. L'entrée et la sortie de matériel se font par l'intermédiaire de sas. Les parties extérieures du matériel introduit étant stérilisées par des vapeurs d'acide peracétique (**Ducluzeau and Raibaud 1967, Vidron et al. 1968, Bromont 1968, Bradley et al. 1967**).

La gnotobiologie désigne la colonisation d'un animal axénique avec un microbiote intestinal sélectionné. Les animaux pourront être dits mono-associés (mono-colonisés, monoxéniques) ou bi-associés dans le cas où ils seront inoculés par une ou deux souches bactériennes seulement. Certaines modèles inoculent les animaux axéniques avec un microbiote humain. Les souris sont souvent utilisées car elles présentent des similitudes au niveau de la composition globale du microbiote intestinal (phyla dominants : *Bacteroidetes* et *Firmicutes*) (**Sekirov et al. 2010**).

### **III.3.2. Méthodes d'études de l'allergie alimentaire**

De nombreux modèles animaux ont été développés afin de constituer des outils pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'allergie alimentaire permettant ainsi de déterminer de nouvelles thérapies et des approches préventives. Différents animaux sont concernés (cobaye, chien, porc, rat et souris) (**Helm and Burks 2002, Herz, Renz and Wiedermann 2004, Lehrer and McClain 2009**). Ces modèles sont indispensables car de nombreuses études ne peuvent pas être conduites chez l'homme pour des raisons éthiques.

Ces modèles doivent mimer le mécanisme de la réaction allergique observée chez l'homme, les protocoles sont donc en général constitués d'une phase de sensibilisation et d'une phase de déclenchement. Ils peuvent cependant s'intéresser uniquement à la phase de sensibilisation allergique.

Les paramètres à définir lors de la constitution du modèle, concernent tout d'abord le choix de l'espèce. Il est en effet important de prendre en compte la prédisposition génétique (forte ou faible production d'IgE). Les souris BALB/c, C3H/HeJ et le rat Brown Norway (BN) sont connus pour leur prédisposition à produire de forte quantité d'IgE comme chez le



sujet atopique. Les souris de la lignée C3H/HeJ possèdent une mutation au niveau des TLR 4 ce qui peut influencer la réponse spécifique dirigée contre les allergènes, car cela affecte la production de cytokines induites par le LPS.

Concernant la sensibilisation expérimentale, ces paramètres regroupent l'âge de l'animal (influence génétique), la concentration de l'allergène (les fortes doses sont connues pour induire la tolérance orale), ainsi que sa forme (le contexte de son origine alimentaire doit être pris en compte), la voie d'administration et la durée de l'exposition à l'allergène (**Helm and Burks 2002**). L'utilisation ou non d'un adjuvant devra également être déterminée, par exemple, la toxine cholérique est connue pour être un adjuvant sélectif des IgE.

Les modalités de la spécificité de réponses devront également être maîtrisées. Par exemple, la réponse Th2 observée chez la souris et le cobaye, peut être caractérisée par la production d'IgE et d'IgG1 tandis que chez le rat cette réponse impliquera la production d'IgG2a.

#### **III.3.2.1. Les modèles murins**

Parmi tous ces modèles, le modèle murin présente des avantages certains du point de vue pratique (petite taille, manipulation facile, reproduction rapide) mais aussi parce que ces animaux sont largement étudiés. Par conséquent, de nombreuses informations sont disponibles, ainsi que de nombreux réactifs permettant de réaliser les analyses. De plus, ces modèles présentent une caractéristique intéressante du point de vue de l'allergie car les réponses immunitaires sont proches de celles observées chez l'homme ; en effet, les réponses Th1 et Th2 impliquées dans l'allergie sont aussi présentes chez les souris.

Il est tout de même important de noter que les différentes lignées murines ne fournissent pas les mêmes résultats, à cause des différences génétiques qui induisent des variations au niveau de la réponse allergique (polarisation Th2, production d'IgE...) (**Untersmayr and Jensen-Jarolim 2006**). Par exemple chez la souris BALB/c, la réaction anaphylactique est normale, alors qu'elle est exacerbée chez les souris C3H/HeJ du fait de son défaut en TLR 4 (**Berin et al. 2006**). Les souris BALB/c, étant reconnues comme de fortes productrices d'IgE, sont considérées comme un modèle possible des personnes atopiques (**Dearman and Kimber 2007**). Les souris C3H/HeJ pourront, elles, être utilisées dans les modèles de réactions anaphylactiques (**Morafo et al. 2003**).

Dans une étude effectuée par Li *et al.*, différentes stratégies ont été appliquées afin de constituer un modèle d'hypersensibilité au lait de vache impliquant la production d'IgE. Dans

cette étude, des souris C3H/HeJ âgées de trois semaines ont été sensibilisées par l'administration par voie intragastrique d'un mélange de lait de vache et de toxine cholérique comme adjuvant. La réaction allergique a ensuite été déclenchée par l'administration orale de lait de vache. L'analyse des résultats a révélé que ce modèle présente les caractéristiques observées chez l'homme dans le cas d'allergie alimentaire au lait de vache médiée par les IgE, comme l'association entre les réactions systémiques (chocs anaphylactiques) et les taux élevés d'IgE spécifiques. Ce modèle induit également des réactions localisées au niveau des systèmes digestif (perméabilité intestinal) et respiratoire ; ce qui peut être très utile pour évaluer les mécanismes impliqués dans l'allergie au lait de vache médiée par les IgE (**Li et al. 1999**). Ce modèle, basé sur l'utilisation de souris C3H/HeJ sensibilisées par voie orale en présence d'adjuvant, a ensuite été adapté à un modèle d'allergie alimentaire à l'arachide. Les résultats de l'étude ont montré que la production d'IgE spécifiques ainsi que les symptômes cliniques sont similaires à ceux retrouvés en cas d'allergie à l'arachide chez l'homme (**Li et al. 2000**).

Un modèle d'allergie a été développé au laboratoire par Adel-Patient *et al.*, chez la souris BALB/c. L'étude comprenait des souris sensibilisées par un extrait de protéines d'arachide ou par des protéines du lait de vache, par voie orale en présence de toxine cholérique ou par voie intra-péritonéale en présence d'alum comme adjuvant. L'évaluation de la réponse immunitaire induite a été réalisée à partir de l'analyse de la production d'anticorps spécifiques (IgE, IgG1 et IgG2a) et de la sécrétion de cytokines (IL-4, IL-5 et IFN- $\gamma$ ) par les splénocytes réactivés. La réaction anaphylactique a été mesurée au niveau local *via* le dosage de l'histamine dans les échantillons fécaux. Les résultats de l'étude montrent que les souris BALB/c développent également les signes caractéristiques chez l'homme d'une sensibilisation allergique au lait de vache ou à l'arachide avec une forte production d'IgE spécifiques d'allergènes (**Adel-Patient et al. 2005b**).

### **III.3.2.2. Sensibilisation expérimentale**

La sensibilisation expérimentale aux protéines alimentaires peut être effectuée selon différentes voies d'administration, généralement les voies orale ou intra-gastrique (i.g.) et intra-péritonéale (i.p.). La voie i.p. est souvent utilisée chez la souris car elle permet d'induire une réponse IgE forte. D'autres voies peuvent être utilisées comme la voie intranasale (**Hazebrouck et al. 2009a**) ou la voie cutanée (**Gonipeta et al. 2009**).

La sensibilisation expérimentale peut être réalisée en présence ou en absence d'adjuvant. L'administration d'un antigène alimentaire par voie orale aboutit généralement à l'induction de la tolérance orale. L'utilisation d'adjuvants est donc souvent nécessaire pour orienter la déviation vers un profil Th2. Un adjuvant est défini comme une substance ayant la capacité d'augmenter la réponse immunitaire dirigée contre un allergène (**Berin and Shreffler 2008**). Les adjuvants utilisés sont en général, des sels d'aluminium (aluns) ou l'adjuvant complet ou incomplet de Freund (CFA ou IFA) pour la voie intra-péritonéale et la toxine cholérique pour la voie orale. Le CFA développé par Jules Freund il y a plus d'un siècle est une émulsion d'eau et d'huile comprenant des mycobactéries tuées. L'IFA ne contient pas les mycobactéries (**Shoenfeld and Agmon-Levin 2011**). La toxine cholérique (CT) est très largement utilisée. Son action sur les muqueuses intestinales favorise le développement de réponses de type Th2. Les adjuvants n'étant pas présents lors de la sensibilisation naturelle, il est important de noter que leur utilisation peut induire certains biais cependant nécessaires à l'inhibition de la tolérance orale.

Il existe tout de même des modèles qui n'impliquent pas l'utilisation d'un adjuvant. La plupart de ces modèles n'utilisent pas la voie orale car elle conduit généralement à l'établissement de la tolérance orale. D'autres voies de sensibilisation comme la voie intra-péritonéale sont alors utilisées. Dans le modèle de Gonipeta *et al.*, la sensibilisation réalisée par l'administration transdermique de BLG en absence d'adjuvant a induit la production d'IgE et le challenge oral a déclenché l'apparition de signes cliniques (**Gonipeta et al. 2009**). On peut noter que mis à part les modèles murins, le cobaye représente un modèle de choix car il possède la caractéristique de pouvoir être sensibilisé par voie orale en absence d'adjuvant. Ce modèle permet donc de représenter les mécanismes de sensibilisation observés chez le sujet humain (**Devey et al. 1976**). Cependant, il est peu utilisé car les réponses immunitaires induites ne sont pas similaires à celles observées chez le sujet humain.

L'évaluation de la réponse induite par la sensibilisation expérimentale pourra être effectuée grâce à l'analyse des marqueurs de la sensibilisation au niveau sérique. Ces marqueurs concernent surtout les IgE. Ces immunoglobulines sont cependant les plus faiblement représentées au niveau sérique. L'évaluation de la production d'IgG (IgG1 et IgG2a) est pertinente car la plupart des protéines alimentaires peuvent induire ce type de réponse anticorps (**Dearman and Kimber 2009**). Les IgA spécifiques (IgA sériques et sIgA) pourront elles aussi être mesurées du fait de leur importance au niveau du système immunitaire intestinal. Les travaux de Frossard *et al.*, ont en effet montré l'importance des sIgA dans les mécanismes de tolérance aux aliments à l'aide d'un modèle d'allergie à la BLG

alors que la présence d'IgA dans le sérum est indicatif d'une sensibilisation de type allergique (**Frossard, Hauser and Eigenmann 2004a**).

Les effets de la sensibilisation expérimentale peuvent être également étudiés au niveau cellulaire en mettant en culture (re-stimulation) les cellules issues des rates et des ganglions mésentériques des souris sensibilisées. Les cytokines sécrétées en réponse à la stimulation pourront être mesurées afin d'observer le profil (TH1/Th2/Th17/Treg) de réponses de ces animaux (**Li et al. 1999, Adel-Patient et al. 2005b, Schouten et al. 2009**).

### **III.3.2.3. Déclenchement expérimental de la réaction allergique (challenge)**

Différentes voies de challenge sont retrouvées parmi les modèles animaux d'allergies. La voie orale (**Schouten et al. 2008, Zuercher et al. 2010**) permet d'analyser des paramètres cliniques proches de ceux observés chez l'homme car elle est par définition la voie impliquée dans l'allergie alimentaire chez l'homme. La voie cutanée (**Schouten et al. 2010**) induit des symptômes au niveau local. La voie nasale (**Fischer et al. 2005**) déclenche des symptômes au niveau respiratoire.

Différents marqueurs cliniques établis à partir des observations réalisées chez l'homme pourront être analysés pour évaluer la réponse allergique induite. Ces marqueurs regroupent différents symptômes (démangeaisons, oedèmes...) qui seront notés en fonction de l'échelle de score associée. Ces observations peuvent cependant poser des limites dues à la subjectivité de l'évaluation des symptômes. La température corporelle est un marqueur sans doute plus objectif (**Frossard et al. 2004b**).

Les marqueurs biologiques utilisés pour caractériser la réaction allergique aux aliments sont en général l'histamine qui peut être détectée au niveau plasmatique (**Li et al. 1999**) ou dans les fèces (**Capobianco et al. 2008, Adel-Patient et al. 2005a**) et les protéases mastocytaires de type 1 (MCP 1) détectées au niveau sérique (**Perrier et al. 2010**).

## IV. OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

---

Les travaux de recherches effectués au cours de ma thèse, visent à analyser l'influence de la présence et de la composition du microbiote intestinal sur le développement et la prévention d'une sensibilisation aux protéines du lait de vache.

Une étude menée au sein de mon laboratoire d'accueil a démontré le rôle protecteur de la présence du microbiote intestinal dans le développement de la sensibilisation expérimentale aux protéines du lait de vache (**Hazebrouck et al. 2009b**). Les résultats ont montré que chez les souris axéniques (Ax), les taux d'IgE et d'IgG1 sériques étaient significativement plus importants durant la réponse primaire et les taux d'IgE persistaient plus longtemps par rapport aux souris conventionnelles (CV). Dans cette étude, la sensibilisation expérimentale a été réalisée par l'administration par voie i.p. de l'allergène purifié en présence d'adjuvant comme la plupart des protocoles de sensibilisation expérimentale.

Nous avons donc voulu dans un premier temps, vérifier si l'utilisation d'adjuvant était réellement nécessaire pour sensibiliser les souris Ax. Cette étude a aussi permis d'évaluer la capacité du modèle « souris Ax » à révéler les propriétés immunogéniques et allergéniques des allergènes majeurs du lait de vache. Pour cette étude des souris Ax et CV ont été sensibilisées par administration par voie i.p. d'un mélange de protéines purifiées en absence d'adjuvant.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les effets de la présence du microbiote intestinal sur la réponse immunitaire induite par une sensibilisation expérimentale, réalisée cette fois par l'administration de lait de vache par voie orale et en présence de toxine cholérique comme adjuvant. Les réponses humorales ont été caractérisées pour différents allergènes (BLG, CAS et  $\alpha$ -Lac) afin de pouvoir comparer leurs potentiels allergéniques. Nous avons voulu évaluer les éventuelles différences en fonction de la voie d'exposition de l'antigène et de la présentation des antigènes au sein de leur milieu d'origine. Nous avons d'autre part analysé les effets de cette sensibilisation sur des souris axéniques inoculées par un microbiote conventionnel à l'âge de six semaines afin d'étudier l'influence d'une colonisation tardive du microbiote intestinal.

Les résultats obtenus à six semaines nous ont poussés à vérifier les effets d'une colonisation plus précoce, chez des souris âgées de trois semaines. Ces souris ont été sensibilisées par l'administration de lait de vache en présence de toxine cholérique par voie orale.

La dernière analyse réalisée concerne l'étude d'une souche de lactobacille (*Lactobacillus casei* BL23). Cette souche a été choisie pour ses caractéristiques immunomodulatrices déjà étudiées au laboratoire ; étant donné l'établissement séquentiel du microbiote intestinal et les informations concernant la nécessité d'une stimulation précoce du système immunitaire. Nous avons décidé d'évaluer les effets de la colonisation néonatale du tractus digestif de souris axéniques. Cette étude a de ce fait, nécessité la production de souris monoxéniques colonisées par cette unique souche bactérienne. La sensibilisation expérimentale a été réalisée par l'administration de lait de vache en présence de toxine cholérique.

# RESULTATS DES TRAVAUX DE THÈSE

---

## I. MISE EN EVIDENCE DU POTENTIEL ALLERGÉNIQUE ET IMMUNOGÉNIQUE DE LA B-LACTOGLOBULINE ET DES CASÉINES BOVINES CHEZ LA SOURIS BALB/C, EN ABSENCE D'ADJUVANT

---

### I.1. CONTEXTE DES TRAVAUX

La plupart des patients souffrant d'allergie au lait de vache développent des réponses IgE dirigées contre la BLG, l' $\alpha$ -lactalbumine et les caséines (Wal 1998).

Les modèles animaux utilisés pour étudier les allergies alimentaires impliquant la production d'IgE doivent représenter les réactions observées chez le sujet humain. Ces modèles permettent d'analyser le pouvoir sensibilisant des protéines grâce à l'administration d'une protéine purifiée ou de l'aliment entier. Cependant, ces modèles sont en général basés sur l'utilisation d'un adjuvant qui permet l'induction d'une sensibilisation allergique caractérisée par la production d'IgE spécifiques alors que cette sensibilisation se produit naturellement en absence d'adjuvant chez le sujet humain. De plus, l'utilisation d'un adjuvant peut favoriser l'induction de réponses IgE dirigées contre des protéines qui ne sont pas décrites comme étant allergéniques (Bowman and Selgrade 2008, Ladics et al. 2010).

Le modèle souris BALB/c caractérisé par une forte production d'IgE a été utilisé dans plusieurs études destinées à l'analyse des propriétés allergéniques et immunogéniques des protéines du lait de vache. Différents protocoles de sensibilisation aux protéines du lait de vache basés sur l'utilisation de ces souris ont été développés au laboratoire.

Ces protocoles ont été adaptés en conditions stériles afin d'être appliqués à des souris BALB/c axéniques (Ax). L'étude réalisée par Hazebrouck *et al.* au laboratoire a utilisé ces modèles afin d'évaluer les différences de réponses à la sensibilisation expérimentale à un

allergène alimentaire en fonction de la présence et de l'absence du microbiote intestinal. Les résultats de cette étude ont permis de démontrer que l'absence de microbiote intestinal induit une plus forte réponse IgE dirigée contre la BLG chez les souris BALB/c Ax, que celle observée chez des souris BALB/c CV, après une sensibilisation par voie intra-péritonéale de BLG purifiée en présence d'IFA, comme dans la plupart des protocoles de sensibilisation utilisant cette voie (**Hazebrouck et al. 2009b**).

Le modèle animal axénique représente ainsi un outil attractif pour l'étude des réactions indésirables aux aliments du fait de sa plus forte réactivité à une sensibilisation expérimentale. Nous nous sommes donc demandé si l'utilisation d'adjuvant était réellement nécessaire pour sensibiliser les souris Ax à des protéines du lait de vache.

Les différents traitements thermiques appliqués au lait de vache comprennent entre autres des procédés de pasteurisation et de stérilisation (UHT). Ces traitements peuvent modifier les interactions entre les différentes protéines du lait et par conséquent modifier les propriétés allergéniques et immunogéniques des allergènes du lait de vache. En effet, la BLG est sensible à la température (thermolabile) alors que la fraction caséine est thermostable. D'autre part la dénaturation due aux traitements thermiques pourrait être à l'origine du démasquage de certains épitopes. Certains allergènes ont des propriétés allergénisantes intrinsèques tandis que pour d'autres allergènes, l'expression de leur caractère allergénique va nécessiter un contexte particulier de présentation. Nous nous sommes donc intéressés à l'évaluation de la capacité du modèle « souris Ax » à révéler les propriétés immunogéniques et allergéniques des allergènes majeurs du lait de vache ainsi que l'impact d'un traitement thermique sur ces propriétés.



## **I.2. OBJECTIFS ET METHODOLOGIE**

Les objectifs de la présente étude ont été d'une part, d'évaluer la capacité de deux allergènes majeurs du lait de vache (BLG et caséines (CAS)) à induire une réponse humorale et cellulaire en absence d'adjuvant chez des souris axéniques. Pour cette première partie, des souris Ax et CV ont reçu deux administrations par voie intrapéritonéale de BLG (GF- BLG, CV- BLG) ou de CAS (GF-CAS, CV-CAS) sans adjuvant. Les souris des lots contrôles ont reçu du PBS (GF-PBS et CV-PBS).

D'autre part, nous avons analysé l'impact du traitement thermique sur l'immunogénicité et l'allergénicité de ces allergènes majeurs du lait de vache. Des souris Ax et CV ont donc reçu un mélange de protéines respectant les proportions retrouvées dans le lait de vache (0,7µg de BLG + 5µg de CAS), chauffé (10 minutes à 95°C) (GF-HP et CV-HP pour Heated Proteins) ou non chauffé (GF-NH et CV-NH pour Non Heated proteins).

L'évaluation des effets de la sensibilisation est effectuée grâce à l'analyse des réponses anticorps et de la production de cytokines par les splénocytes réactivés *in vitro* en présence de BLG ou de CAS.

### **I.3. PRINCIPAUX RÉSULTATS ET CONCLUSIONS**

Nous avons observé que chez les souris conventionnelles l'administration de BLG ou de CAS par voie i.p. en absence d'adjuvant ne conduit pas au développement d'une réponse anticorps spécifique.

Cependant, chez les souris axéniques, la sensibilisation expérimentale par l'administration de BLG par voie i.p. en absence d'adjuvant, induit une réponse IgE et IgG1 spécifique alors que l'administration de CAS induit uniquement une réponse IgG1 dirigée contre les caséines  $\kappa$  et  $\alpha$ S1.

L'absence de réponse IgE dirigée contre les caséines indique que ce modèle ne permet pas de révéler les propriétés allergéniques de tous les allergènes, ce qui suggère que le nombre d'injections ou le mode d'administration étaient peut-être inadéquats pour l'induction d'une sensibilisation aux caséines.

Le traitement thermique (chauffage 10 min à 95°C) diminue le potentiel allergénique de la BLG car nous mesurons des niveaux d'IgE spécifiques moins importants chez les souris GF-HP. Cependant ce traitement augmente tout de même l'immunogénicité des protéines car nous observons une production significative d'IgG1 dirigée contre la BLG et la caséine  $\kappa$  chez les souris axéniques et conventionnelles. Ceci est en accord avec des données précédentes qui indiquent que le traitement thermique diminue le potentiel allergénique de la BLG (**Nowak-Wegrzyn et al. 2008, Paajanen et al. 2003**).

De façon générale, les résultats de notre étude confirment que les souris Ax présentent une plus forte réactivité au potentiel immunogénique et allergénique de la BLG. Les réponses induites par l'injection de la CAS montrent les limites de ce modèle pour la caractérisation des propriétés allergéniques de certaines protéines.

Le lait de vache étant un aliment très complexe, ces résultats suggèrent qu'il doit être considéré dans son ensemble car il existe des interactions entre les différentes protéines présentes, conduisant ainsi à l'expression de leurs caractéristiques immunogéniques et allergéniques. C'est pourquoi, nous avons décidé pour la suite de nos études de sensibiliser les souris par voie orale avec l'aliment entier (lait de vache) afin de pouvoir comparer les propriétés sensibilisantes des allergènes majeurs du lait de vache.

**Allergenic and immunogenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice.**

**Stéphanie Morin<sup>1</sup>, Hervé Bernard<sup>1</sup>, Laetitia Przybylski-Nicaise<sup>1</sup>, Gérard Corthier<sup>2</sup>, Sylvie Rabot<sup>2</sup>, Jean-Michel Wal<sup>1</sup> and Stéphane Hazebrouck<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> INRA, UR 496 - Immuno-Allergie Alimentaire, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette

<sup>2</sup> INRA, UMR 1319 - Micalis, 78352 Jouy-en-Josas, France

**Correspondence:** Dr. Stéphane Hazebrouck, Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, INRA, iBiTec-S, SPI-Bât. 136, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

**E-mail:** stephane.hazebrouck@cea.fr

**Fax:** +33-1-69-08-59-07

**Abbreviations:** **BLG**,  $\beta$ -lactoglobulin; **BLGn**, native BLG; **BLGd**, denatured BLG, **CAS**, whole casein fraction; **CMA**, cow's milk allergy, **CMP**, caseinomacropéptide; **GF**, germ-free; **CV**, conventional

**Keywords:** Allergen/ $\beta$ -lactoglobulin/Casein/Germ-free/Heat-treatment/Immunogenicity

## **Abstract**

**Scope:** In most animal models of allergy, the development of an IgE response requires the use of an adjuvant. Germ-free (GF) mice exhibit Th2-polarized antibody responses combined with defective immunosuppressive mechanisms. The sensitizing potential of milk proteins was investigated in GF mice in the absence of adjuvant.

**Methods and results:**  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and caseins (CAS) allergenicity was evaluated by means of intraperitoneal injections without adjuvant. Injections of BLG induced significant IgE and IgG1 responses in GF mice while CAS injections provoked the production of IgG1 toward  $\kappa$ - and  $\alpha$ S1-caseins. No significant antibody response was evidenced in conventional (CV) mice. After *in vitro* BLG-reactivation, IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  productions by splenocytes were higher in GF mice than in CV mice. Heat-treatment decreased BLG allergenicity as indicated by the absence of IgE production in GF mice. However, heat-treatment increased protein immunogenicity and led to the production of anti-BLG and anti- $\kappa$ -casein IgG1 in both GF and CV mice. This correlated with enhanced productions of IL-4, IL-5 and IL-13 in BLG-reactivated splenocytes from CV mice.

**Conclusions:** Gut colonization by commensal bacteria appeared then to significantly reduce the susceptibility of mice toward the intrinsic allergenic and immunogenic potential of milk proteins.

## 1 Introduction

Cow's milk allergy (CMA) affects about 2.5% of infants during their first years of life and is the most common food allergy in early childhood [1]. Although most children outgrow CMA by 3 years of age, CMA increases the risk of developing persistent CMA and other atopies, such as allergic asthma, atopic eczema, rhinoconjunctivitis or egg allergy [2]. Patients suffering from CMA develop an IgE response toward different cow's milk proteins. They are mainly sensitized to  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and  $\alpha$ -lactalbumin from the whey fraction and to  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins from the whole casein (CAS) fraction [3]. BLG is susceptible to heat denaturation that leads to the exposure of new antigenic sites and thus enables the production of antibodies specific to non-conformational, *i.e.* sequential epitopes [4]. In contrast, caseins are natively unfolded proteins [5, 6]. Their antigenicity and allergenicity are not affected by heat-treatment [7-9].

In most murine models of allergy, an adjuvant is used in order to enhance IgE responses and to elicit allergic reactions [10-13]. However, the use of adjuvant may induce specific IgE responses against proteins that are usually not considered as allergenic [14, 15]. Thereby, protocols without adjuvant have been proposed to study the intrinsic allergenic potential of a protein. As oral administration leads generally to the induction of oral tolerance, other routes of administration have been considered such as transdermal applications or intraperitoneal (i.p.) injections. These strategies have been particularly tested on BALB/c mice that present a profile of high IgE responders equivalent to an atopic phenotype [16]. Transdermal sensitization to milk proteins led to the induction of an IgE response toward BLG and  $\alpha$ -lactalbumin while after i.p. injections of BLG at different doses, most of the evaluated mouse models required adjuvant to get IgE [15, 17, 18].

Germ-free (GF) mice are reared in a sterile environment and thereby, exhibit an immature immune system because of the absence of viable bacteria [19]. We recently

investigated the influence of the gut microbiota on the sensitization level of BALB/c mice after i.p. injection of BLG with incomplete Freund's adjuvant. GF mice were shown to develop a higher BLG-specific IgE response than conventional (CV) mice [20]. The immunosuppressive mechanisms observed in CV mice, presumably through the activation of Treg cells, were also reported to be defective in GF mice [21-23]. In this regard, the absence of efficient immunosuppressive mechanisms in GF BALB/c mice could be of interest in order to avoid the use of adjuvant for evaluating the sensitizing potential of a protein.

In the present work, we investigated whether the intrinsic allergenic and immunogenic potential of two major milk allergens, namely BLG and CAS, could be evidenced in GF mice in the absence of adjuvant. The capacity of BLG,  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins, to induce systemic antibody responses was first determined. The cellular response was also evaluated by performing *in vitro* splenocytes reactivation. In addition, we tested whether heat-treatment of BLG and CAS mixed together, and the resulting intermolecular rearrangements, could affect the humoral and cellular response induced by i.p. injections of these proteins.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Reagents**

Caseins and BLG were isolated, purified and characterized, as previously described [24]. In order to inhibit proteolytic degradation by plasmin, the purification of caseins involved heat-treatment (20 min at 100°C, [25]). Endotoxin levels in purified milk proteins were below the detection limit of 0.1 EU/mg (QCL-1000 kit, Lonza Walkersville, Walkersville, Md, USA).

The BLG purified from cow's milk is considered to be BLG in the native conformation (BLGn). Reduced and alkylated BLG, prepared as described by Negroni *et al.* [4], is considered to be BLG in a denatured conformation (BLGd). A solution containing CAS (2.34 mg/mL) and BLG (0.33 mg/mL) in PBS (100  $\mu$ L) was heated in an Eppendorf Biopur tube for

10 min at 95°C before being rapidly cooled in an ice-water mixture. Quantification of the residual native BLG was performed and showed that more than 94% of the BLG was heat-denatured [4].

## 2.2 Mice

Conventional SOPF female BALB/cByJ mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), were used after having checked the absence of milk protein in their diet. Germ-free BALB/cByJ mice were bred in the germ-free animal facilities (ANAXEM platform, INRA, Jouy-en-Josas, France) and housed in sterile Trexler-type isolators (Getinge-La Calhène, Vendôme, France). Autoclaved tap water and a sterilized pelleted standard chow deprived of cow's milk proteins (R03, SAFE, Augy, France) were given ad libitum. The germ-free status was monitored by aerobic and anaerobic culture of feces and by microscopic examination of fecal preparations. Animals were 7-8 weeks old at the start of the experiments. All experiments were performed with permission 91-493 of the French Veterinary Services.

## 2.3 Experimental protocols

In a first set of experiments, GF and CV mice (n=8/group) were injected intraperitoneally with 5 µg of filter-sterilized BLG (GF-BLG and CV-BLG) or CAS (GF-CAS and CV-CAS) dissolved in D-PBS (Gibco, Invitrogen) on day 1 and day 18. Blood samples from the retro-orbital venous sinus and fecal samples were collected on day 11 and 31. Control GF and CV mice injected with D-PBS (GF-PBS and CV-PBS, n=8/group) were bled on the same days. On day 36, spleens were collected for *in vitro* reactivation. In a second set of experiments, GF and CV mice (n=8/group) were injected intraperitoneally with a heated (GF-HP and CV-HP) or non-heated (GF-NP and CV-NP) mix containing 5 µg of CAS and 0.7 µg of BLG on day 1 and 19. Blood samples were collected on day 32 and spleens were collected on day 36.

#### **2.4 Quantification of BLG-specific antibodies in serum and in feces.**

Epitope specificity of BLG-specific antibodies was determined using two different assays. The detection of antibodies recognizing both sequential and conformational epitopes of BLG<sub>n</sub> was performed by using biotinylated BLG immobilized on neutravidin-coated plates. The detection of antibodies recognizing only the denatured form of BLG was performed by using BLG<sub>d</sub>-coated plates. Purified caseins were as well directly coated. Plates were then incubated overnight with diluted sera (1:50 unless otherwise noted) in EIA buffer (0.1 M phosphate buffer, 0.1 % BSA, 0.15 M NaCl). Allergen-specific IgG1, IgG2a, IgA and IgE binding and measurement of total IgE levels were performed as previously described [10]. Results are reported as absorbance units (AU) at 414 nm. Non-specific binding (NSB) was determined using sera from PBS-injected mice. A response was considered significant when higher than NSB + 3 $\sigma_{n-1}$ . Secretion of specific IgA and IgG1 in fecal samples was also measured [26].

#### **2.5 Spleen cell culture and cytokine productions**

At the end of the experiments, spleens from each group of mice were pooled in RPMI-10 (RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal calf serum, 2 mM L-Glutamine, 100 U penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin). After lysis of red blood cells (180 mM NH<sub>4</sub>Cl, 17 mM Na<sub>2</sub>EDTA), splenocytes were resuspended in RPMI-10. Cells were incubated for 60h at 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) in 96-well culture plates (10<sup>6</sup> cells/well) in the presence of BLG (20  $\mu$ g/mL), CAS (20  $\mu$ g/mL) or D-PBS (negative control). The IL-4 and IFN- $\gamma$  cytokines level was assayed in duplicate using CytoSets™ kit (BioSource International Europe, Nivelles, Belgium). IL-5 and IL-13 were assayed using the BioPlex technology according to the manufacturer's recommendations (BioRad, Hercules, CA, USA). No statistical analysis was performed as results are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determination on pools.



## **2.6 Statistical analyses.**

Data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test to compare the different groups with the control group. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 software and a  $P < 0.05$  was considered significant (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## **3 Results**

### **3.1 Susceptibility of GF and CV BALB/c mice to the intrinsic allergenicity and immunogenicity of BLG and CAS**

#### **3.1.1 Antibody responses**

BLG and CAS were first separately injected in GF and CV mice. After the first i.p. injection, no antibody response was detected in GF and CV mice (data not shown). After the second injection, a significant production of BLG-specific IgE ( $P = 0.03$ , 5/8 mice), in correlation with a significant increase of total IgE production (Spearman non parametric correlation,  $r = 0.903$ ,  $P = 0.002$ ), and IgG1 ( $P = 0.002$ , 6/8 mice) was evidenced in GF mice only (Fig. 1A and 1B). Of note, the basal level of total IgE was significantly lower in GF mice compared to CV mice, as expected since GF mice exhibit a biased systemic immunity with low immunoglobulin levels [19]. Injections of CAS led also to the production of specific IgG1 in GF mice only ( $P = 0.001$ , 8/8 mice, Fig. 1C) but no CAS-specific IgE response was detected (data not shown). Among CAS constituents, only  $\kappa$ - and  $\alpha$ S1-caseins were immunogenic ( $P = 0.001$ , 8/8 GF mice and  $P = 0.009$ , 6/8 GF mice, respectively, Fig. 1C) whereas IgG1 response to  $\alpha$ S2- and  $\beta$ -caseins was not significant (data not shown). No specific IgG2a and IgA response in sera and no specific antibody response in fecal extracts were observed (data not shown).

### **3.1.2 Cytokine productions**

After BLG-reactivation, secretion of Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) by splenocytes from BLG-injected GF mice was at least four-fold enhanced compared to CV mice (Fig. 2A). Production of Th1 cytokine IFN- $\gamma$  was also two-fold higher in GF than in CV mice. After CAS-reactivation, production of IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines was comparable between GF and CV mice. Only IFN- $\gamma$  production could distinguish the GF mice from the CV mice since CAS-specific secretion of IFN- $\gamma$  was null in GF mice (Fig. 2B).

## **3.2 Influence of heat-treatment on the immunogenic and allergenic potential of BLG and CAS.**

In order to take into account the formation of intermolecular disulfide bridges during heat-treatment between BLG and CAS, the proteins were mixed together with respect to the ratio BLG/CAS found in cow's milk and then heated for 10 minutes at 95°C.

### **3.2.1 Antibody responses**

Despite a lower dose of BLG (0.7  $\mu$ g), IgE production was still significant in sera from GF mice injected with the mix of native BLG and CAS (P=0.04, 5/8 mice, Fig. 3A). However, production of BLG-specific IgE was not significant after injection of heated proteins. As no IgE to denatured BLG (BLGd) was detected in sera from any group of mice, IgE observed in the GF-NP group were thereby directed against BLG conformational epitopes (Fig. 3B). In contrast, heat-treatment enhanced BLG immunogenicity. Indeed, production of IgG1 specific to BLGd was significant in both GF mice and CV mice (P=0.01, 6/8 GF mice and P=0.03, 6/8 CV mice) whereas, without heat-treatment, BLGn-specific IgG1 response was significant only in GF mice (P=0.01, 6/8 mice).

As previously observed, no CAS-specific IgE was detected in any group of mice (data not shown) while production of IgG1 specific to  $\kappa$ -casein (P=0.001, 8/8 mice) and  $\alpha$ S1-casein (P=0.01, 6/8 mice) was still significant in the GF-NP group. Injection of heated proteins induced as well an IgG1 response toward  $\kappa$ - and  $\alpha$ S1-caseins (P=0.01, 6/8 mice, Fig. 3C) but responses against  $\beta$ - and  $\alpha$ S2-caseins remained not significant (data not shown). Remarkably, the IgG1 response to  $\kappa$ -casein was significant in CV-HP mice (P=0.009, 6/8 mice).

As the IgG1 response to  $\kappa$ -casein was particularly strong, immunogenicity of the para  $\kappa$ -casein (1-105) and the caseinomacropptide (CMP, 106-169), was further compared. The IgG1 response in the GF-NP group appeared then to be mainly directed toward the CMP (Fig.4), as similarly observed in the GF-HP and CV-HP groups (data not shown).

### **3.2.2 Cytokine productions**

After BLG-reactivation of splenocytes from mice injected with non-heated proteins, secretion of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  was still higher in GF mice than in CV mice (Fig. 5 and 2).

The pattern of secreted cytokines was substantially different in mice injected with heated proteins since productions of IL-4, IL-5 and IL-13 were 2 to 3-fold higher in CV mice than in GF mice. After CAS-reactivation, secretion of IL-5 or IL-13 was not affected by heat-treatment while IL-4 production tended to increase. Heat-treatment had more effect on IFN- $\gamma$  production, which was reduced in CV mice and enhanced in GF mice.

## **4 Discussion**

In the present study, the propensity of GF mice to develop excessive humoral and cellular responses compared to CV mice was investigated in order to evidence the intrinsic allergenic and immunogenic potential of BLG and CAS.

First, the Th2-biased humoral response previously reported in GF BALB/c mice was confirmed since only IgE and/or IgG1 were detected after injection of BLG or CAS [20, 23]. Contrarily to BLG, no CAS-specific IgE was detected. This result is in accordance with another adjuvant-free mouse model aiming to evaluate the allergenicity of milk proteins through the transdermal route. In that work, IgE have been evidenced only against proteins from the lactosera but not against  $\beta$ - or  $\kappa$ -casein [17]. The absence of CAS-specific IgE response suggest that establishment of an allergic response to CAS may require a higher number of i.p. injections since frequencies of administration are critical [15]. On the other hand, the absence of CAS-specific IgE could also indicate that the role of the food matrix, the digestive processes and other environmental factors are important for CAS allergenicity as previously described for purified peanut allergens [27]. In this case, evaluation of intrinsic properties through i.p. injections of purified proteins could not be used to predict accurately their potential allergenicity, as suggested by Ladics *et al.* [15].

However, GF mice appeared to be particularly susceptible to CAS immunogenicity since all GF mice and no CV mice were found to be responsive. The ratio of  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in the micelle (3:1:3:1, respectively) does not account for their relative immunogenicity since only  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins were immunogenic in GF mice. In CM-allergic patients, comparison of the humoral responses to the four caseins reveals that allergenicity of cow's milk proteins is positively correlated with their immunogenicity and that  $\alpha$ S1-casein is often the most allergenic and immunogenic casein [28-30]. In this regard, the development of an IgG1 response to  $\alpha$ S1-casein in GF mice is in good agreement with the prevalence data. The fact that  $\kappa$ -casein was the most immunogenic casein in GF mice was more surprising. However,  $\kappa$ -casein, and particularly its hydrophilic C-terminal half containing the CMP, was previously reported to be highly immunogenic in mice immunized with whole casein [5]. The high immunogenicity of the CMP is indeed consistent with the

general conception that  $\kappa$ -casein is localized at the surface of the micelle [31]. Thus, although  $\kappa$ -casein is not described as the most immunogenic or allergenic casein, we may wonder whether the development of an early and rapid IgG1 response toward  $\kappa$ -casein could promote the subsequent development of IgG and IgE responses toward other caseins.

We further investigated the impact of heat-treatment on the allergenic potential of BLG and CAS. Heat-treatment denatured BLG and inhibited in GF mice the IgE response that was shown to be directed against the conformational epitopes of BLG. Moreover, the specificity of the IgG1 response reflected properly the conformational state of the BLG injected in GF mice. Indeed, the IgG1 response against BLGn in mice injected with heat-denatured protein or against BLGd in mice injected with non-heated protein was not significant. In contrast, only heat-denatured BLG was able to induce a BLG-specific IgG1 response in CV mice. Previous reports using adjuvant showed that heat-denaturation of allergens could reduce their sensitising potential while triggering their immunogenicity [32]. The greater immunogenicity of heated proteins is then probably due to the generation of aggregates which are known to be more immunogenic than soluble proteins [33]. Pasteurization of milk proteins was also shown to improve BLG immunogenicity, but in this case, IgE response was significantly increased [7]. This discrepancy could be due to the lower temperature used during pasteurization, around 63-72°C, which could have just partially denatured BLG. But, in agreement with our data, reactivation of splenocytes by BLG led to increased secretions of IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  in mice sensitized with pasteurized BLG. In GF mice, secretion of Th2 cytokines by splenocytes tended to decrease after heat-treatment, thus reflecting the absence of IgE response toward BLGd.

While the humoral CAS-specific response in GF mice was not markedly affected by heat-treatment, the most striking effect was the production of IgG1 toward  $\kappa$ -casein in CV mice. As this was correlated with the production of BLG-specific IgG1, the concomitant

enhanced immunogenicity of BLG and  $\kappa$ -casein may result from the formation of disulfide bridges between the two proteins during heat-treatment [34]. The formation of aggregates between BLG and  $\kappa$ -casein may thus improve the immunogenicity of both proteins in CV mice. Remarkably, after heat-treatment, reactivation of splenocytes by BLG or by CAS resulted in very similar profile of cytokine secretion. This may reveal a possible effect of milk protein aggregation that conferred to BLG and CAS a comparable potential for *in vitro* stimulation of splenocytes.

In conclusion, GF mice exhibited an enhanced susceptibility to the allergenic and/or immunogenic potential of BLG and CAS. Only the native form of BLG, in comparison with BLGd, could induce an IgE response. The specificity of the IgG1 response reflected also the conformational structure of the BLG injected into mice. In addition, only  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins were immunogenic while no response was evidenced toward  $\alpha$ S2- and  $\beta$ -caseins. As CAS injections did not lead to the production of specific IgE, this approach remains inadequate for predicting the potential allergenicity of proteins. Nevertheless, the higher susceptibility of GF mice could certainly be advantageously used to study the impact of the gut microbiota on the development of an allergic response and to investigate the relative importance of the food matrix and other environmental factors during the sensitization process to cow's milk proteins. In this regard, other routes of allergen exposure are currently under investigation.

*We thank Benoit Lignon-Couffon and Pascal Guillaume for careful breeding of germ-free mice; Anne Foussier and Sandrine Ah-Leung for skilled technical assistance. Stephanie Morin is recipient of a grant from the department of Alimentation Humaine (AlimH, INRA, France). Catherine Hazebrouck is remembered with affection. The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, *125*, S116-S125.
- [2] Saarinen, K. M., Pelkonen, A. S., Makela, M. J., Savilahti, E., Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, *116*, 869-875.
- [3] Wal, J. M., Cow's milk allergens. *Allergy.* 1998, *53*, 1013-1022.
- [4] Negroni, L., Bernard, H., Clement, G., Chatel, J. M., *et al.*, Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods.* 1998, *220*, 25-37.
- [5] Johansson, A., Lugand, D., Rolet-Repecaud, O., Molle, D., *et al.*, Epitope characterization of a supramolecular protein assembly with a collection of monoclonal antibodies: the case of casein micelle. *Mol Immunol.* 2009, *46*, 1058-1066.
- [6] Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., *et al.*, Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Mol Nutr Food Res.* 2010, *54*, 1677-1689.
- [7] Roth-Walter, F., Berin, M. C., Arnaboldi, P., Escalante, C. R., *et al.*, Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy.* 2008, *63*, 882-890.
- [8] Morisawa, Y., Kitamura, A., Ujihara, T., Zushi, N., *et al.*, Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy.* 2009, *39*, 918-925.
- [9] Han, N., Jarvinen, K. M., Cocco, R. R., Busse, P. J., *et al.*, Identification of amino acids critical for IgE-binding to sequential epitopes of bovine kappa-casein and the similarity of

these epitopes to the corresponding human kappa-casein sequence. *Allergy*. 2008, *63*, 198-204.

- [10] Adel-Patient, K., Creminon, C., Bernard, H., Clement, G., *et al.*, Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine beta-lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice. *J Immunol Methods* 2000, *235*, 21-32.
- [11] Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., Wal, J. M., Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 2005, *60*, 658-664.
- [12] Li, X. M., Schofield, B. H., Huang, C. K., Kleiner, G. I., Sampson, H. A., A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1999, *103*, 206-214.
- [13] Fritsche, R., Utility of animal models for evaluating hypoallergenicity. *Mol Nutr Food Res*. 2009, *53*, 979-983.
- [14] Bowman, C. C., Selgrade, M. K., Differences in allergenic potential of food extracts following oral exposure in mice reflect differences in digestibility: potential approaches to safety assessment. *Toxicol Sci*. 2008, *102*, 100-109.
- [15] Ladics, G. S., Knippels, L. M., Penninks, A. H., Bannon, G. A., *et al.*, Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010, *56*, 212-224.
- [16] Dearman, R. J., Kimber, I., A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods* 2007, *41*, 91-98.
- [17] Gonipeta, B., Parvataneni, S., Tempelman, R. J., Gangur, V., An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein. *J Dairy Sci*. 2009, *92*, 4738-4744.



- [18] Adel-Patient, K., Guimaraes, V. D., Paris, A., Drumare, M. F., *et al.*, Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. *PLoS One* 2011, 6, e16346.
- [19] Smith, K., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 2007, 19, 59-69.
- [20] Hazebrouck, S., Przybylski-Nicaise, L., Ah-Leung, S., Adel-Patient, K., *et al.*, Allergic sensitization to bovine beta-lactoglobulin: comparison between germ-free and conventional BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009, 148, 65-72.
- [21] Ostman, S., Rask, C., Wold, A. E., Hultkrantz, S., Telemo, E., Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur.J Immunol.* 2006, 36, 2336-2346.
- [22] Ishikawa, H., Tanaka, K., Maeda, Y., Aiba, Y., *et al.*, Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 2008, 153, 127-135.
- [23] Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., Kihara-Fujioka, M., *et al.*, Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol Lett.* 2010, 132, 45-52.
- [24] Blanc, F., Bernard, H., Alessandri, S., Bublin, M., *et al.*, Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Mol Nutr Food Res.* 2008, 52 Suppl 2, S166-S175.
- [25] Saint-Denis, B. T., Humbert, G., Gaillard, J. L., Enzymatic assays for native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk. *J Dairy Res.* 2001, 68, 437-449.
- [26] Hazebrouck, S., Przybylski-Nicaise, L., Ah-Leung, S., Adel-Patient, K., *et al.*, Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine beta-lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine.* 2009, 27, 5800-5805.

- [27] van Wijk, F., Nierkens, S., Hassing, I., Feijen, M., *et al.*, The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicol Sci.* 2005, 86, 333-341.
- [28] Bernard, H., Creminon, C., Yvon, M., Wal, J. M., Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998, 115, 235-244.
- [29] Ruiter, B., Knol, E. F., van Neerven, R. J., Garssen, J., *et al.*, Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4. *Clin Exp Allergy.* 2007, 37, 1103-1110.
- [30] Shek, L. P., Bardina, L., Castro, R., Sampson, H. A., Beyer, K., Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy.* 2005, 60, 912-919.
- [31] Horne, D. S., Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr Opin Colloid Interf. Sci.* 2006, 11, 148-153.
- [32] Johansen, P., Senti, G., Martinez Gomez, J. M., Wuthrich, B., *et al.*, Heat denaturation, a simple method to improve the immunotherapeutic potential of allergens. *Eur J Immunol.* 2005, 35, 3591-3598.
- [33] Rosenberg, A. S., Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006, 8, E501-E507.
- [34] Lowe, E. K., Anema, S. G., Bienvenue, A., Boland, M. J., *et al.*, Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. 2. Disulfide bonding patterns between bovine beta-lactoglobulin and kappa-casein. *J Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7669-7680.

## Figure legends

**Figure 1.** BLG-specific IgE responses, total IgE and correlation between specific and total IgE in the GF-BLG group (A), specific IgG1 responses toward BLG (B), and CAS,  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins (C). GF mice (open symbols) and CV mice (black symbols) were intraperitoneally injected with D-PBS (control, GF-PBS and CV-PBS), BLG (5  $\mu$ g, GF-BLG and CV-BLG) or CAS (5  $\mu$ g, GF-CAS and CV-CAS), without adjuvant (see section 2). Assays were performed as duplicate on sera from 8 mice/group. Sera were diluted 1:500 for the BLG-specific IgG1 determination and 1:50 otherwise. Specific Ig levels were reported as absorbance units at 414 nm and means are indicated. Significantly different from the control group (Mann-Whitney test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ ).

**Figure 2.** Cytokines secretions by (A) BLG- or (B) CAS-reactivated splenocytes from mice intraperitoneally injected with BLG or CAS (see section 2). Cells were incubated for 60h at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Results are represented as cytokines secretions in supernatants of reactivated splenocytes after subtraction of cytokines assayed in supernatants of D-PBS-reactivated splenocytes, thus corresponding to specific production.

**Figure 3.** Specific IgG1 and IgE responses toward BLG (A), denatured BLGd (B),  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins (C). GF mice (open symbols) and CV mice (black symbols) were intraperitoneally injected with D-PBS (control, GF-PBS and CV-PBS), a non-heated mix of BLG + CAS (0.7  $\mu$ g + 5  $\mu$ g, GF-NP and CV-NP) or a heated mix of BLG + CAS (0.7  $\mu$ g + 5  $\mu$ g, GF-HP and CV-HP, see section 2). Sera were diluted 1:50. Specific Ig levels were reported as absorbance units at 414 nm and means are indicated. Significantly different from the control group (Mann-Whitney test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ ).

**Figure 4.** Specificity of the IgG1 response toward  $\kappa$ -casein in GF mice intraperitoneally injected with a non-heated mix of BLG + CAS (0.7  $\mu$ g + 5  $\mu$ g, GF-NP). The IgG1 response is mainly directed toward the C-terminal part of  $\kappa$ -casein (CMP) as compared with the N-terminal part (para  $\kappa$ -casein). Wilcoxon signed rank test, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

**Figure 5.** Cytokines secretions by (A) BLG- or (B) CAS-reactivated splenocytes from mice intraperitoneally injected with D-PBS (control, GF-PBS and CV-PBS), a non-heated mix of BLG + CAS (0.7  $\mu$ g + 5  $\mu$ g, GF-NP and CV-NP) or a heated mix of BLG + CAS (0.7  $\mu$ g + 5  $\mu$ g, GF-HP and CV-HP) (see section 2). Cells were incubated for 60h at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Results are represented as cytokines secretions in supernatants of reactivated splenocytes after subtraction of cytokines assayed in supernatants of D-PBS-reactivated splenocytes, thus corresponding to specific production.

Figure 1.

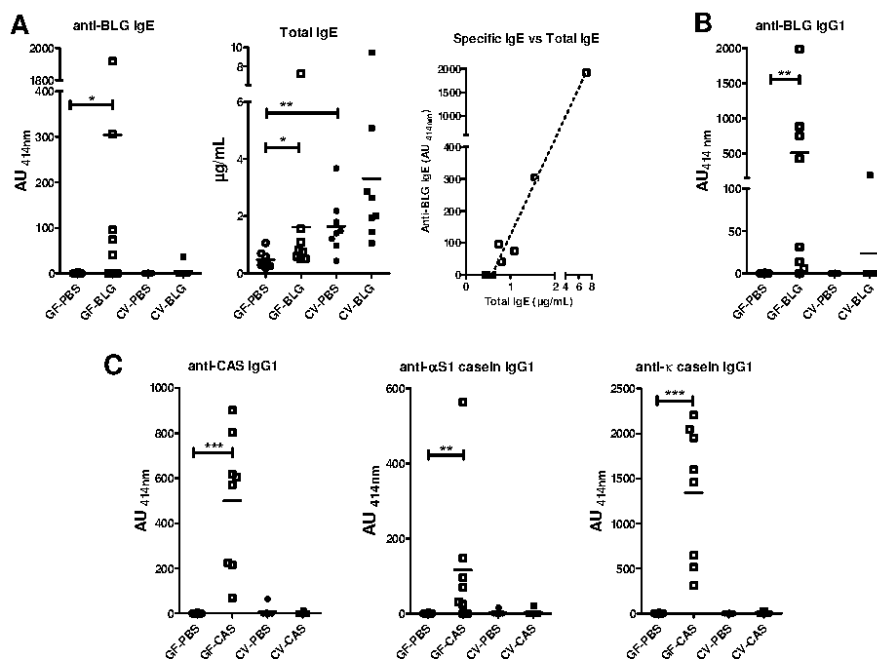


Figure 2.

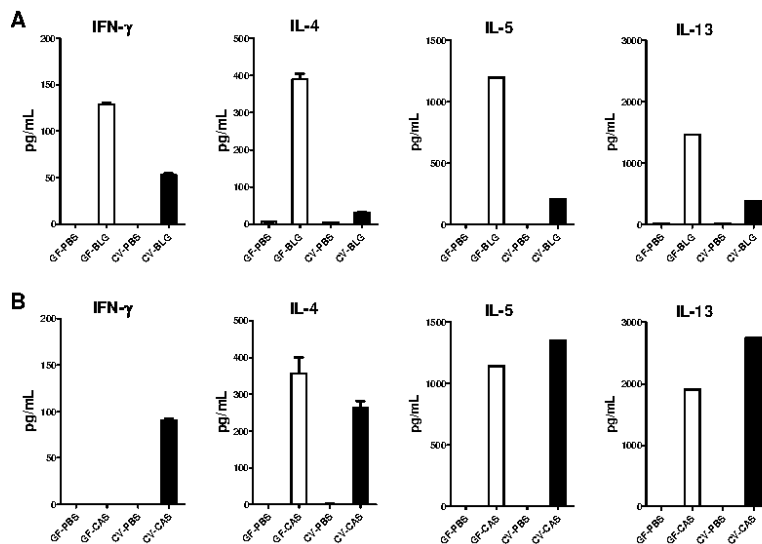


Figure 3.

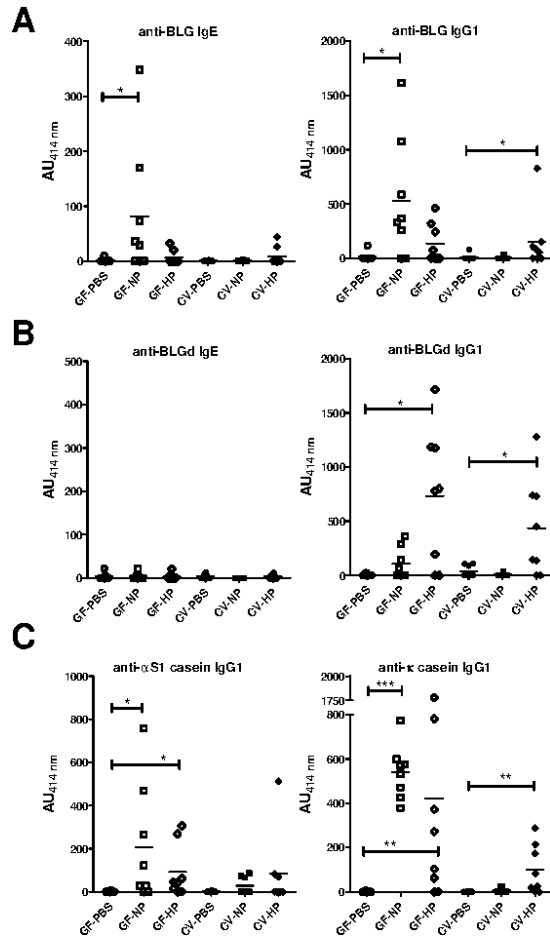


Figure 4.

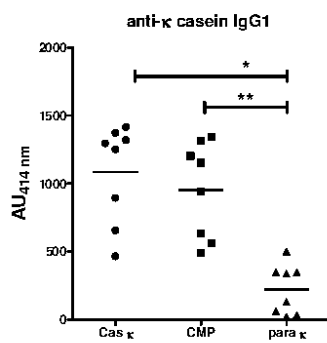
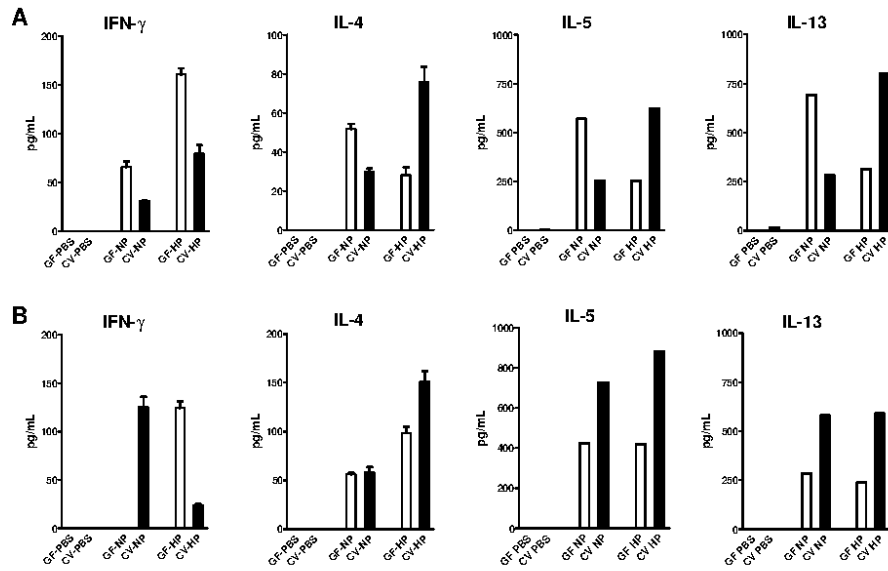


Figure 5.







## II. IMPACT DE LA COLONISATION DU TRACTUS DIGESTIF A L'AGE DE 6 SEMAINES SUR LA SENSIBILISATION AU LAIT DE VACHE

---

### II.1. CONTEXTE DES TRAVAUX

Les résultats de l'étude précédente, effectuée pour évaluer la capacité des souris BALB/c axéniques à révéler le potentiel allergénique et immunogénique de la BLG et de la CAS *via* l'administration par voie intra péritonéale en absence d'adjuvant, montrent que ce modèle n'est pas adapté à l'étude des propriétés allergéniques de la CAS (**Morin et al. 2011**).

De plus, l'allergénicité des différentes protéines du lait de vache peut varier en fonction des conditions d'exposition des allergènes. En effet, les allergènes purifiés n'ont pas les mêmes propriétés que lorsqu'ils sont ingérés au sein de la matrice alimentaire.

Dans le cas de l'allergie aux protéines du lait de vache, la voie orale est *a priori* la voie de sensibilisation principale chez le sujet humain. Elle implique cependant l'utilisation d'un adjuvant nécessaire à l'inhibition de la tolérance orale induite naturellement par cette voie d'administration dans les modèles murins.

La toxine cholérique fait partie des adjuvants des muqueuses les plus efficaces et les plus largement étudiés (**Schnitzler, Burke and Wetzler 2007**). Chez les souris, l'administration orale d'antigènes en présence de toxine cholérique engendre une mémoire immunologique à long terme (**Vajdy and Lycke 1992**) caractérisée par des réponses spécifiques des antigènes impliquant les lymphocytes (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) et les IgA sécrétoires (**Clarke et al. 1991**).

Ces réponses sont également caractérisées par des taux élevés d'IgG1 et d'IgE sériques (**Marinaro et al. 1995, Vajdy et al. 1995**) et de cytokines de type Th2 principalement (IL-4, IL-5...) (**Okahashi et al. 1996, Wilson et al. 1991**). Différentes études rapportent l'utilisation de la toxine cholérique pour sensibiliser oralement des souris conventionnelles à des protéines du lait de vache (**Adel-Patient et al. 2005b, Li et al. 1999**). L'utilisation de cet adjuvant a aussi permis de sensibiliser par voie orale des souris axéniques aux protéines du lactosérum ou à l'ovalbumine (**Rodriguez et al. 2011, Gaboriau-Routhiau and Moreau 1996**).

## **II.2. OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE**

Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer les propriétés allergéniques et immunogéniques des allergènes majeurs du lait de vache (BLG, caséines et  $\alpha$ -lactalbumine) chez des souris axéniques (GF), conventionnelles (CV) et conventionnalisées (CVD). Les souris de cette étude ont reçu du lait stérilisé à Ultra Haute Température (UHT, chauffage à 140°C pendant quelques secondes) en présence de toxine cholérique filtrée afin de préserver le statut stérile des souris axéniques tout en prenant en compte les effets de la matrice alimentaire des protéines du lait de vache.

Le traitement thermique (UHT) dénature la majeure partie de la BLG mais jusqu'à 2 à 10% de la BLG peut conserver sa conformation native (**Chen et al. 2005**). L'induction d'une réponse IgE dirigée contre des protéines dénaturées présente toutefois l'avantage d'aborder la spécificité de réponses des patients dont l'allergie au lait de vache persiste. En effet, il a été reporté que la spécificité des IgE de ces patients est plutôt orientée contre les protéines dénaturées (et des épitopes linéaires) alors que les allergies moins sévères tolèrent mieux les produits laitiers traités thermiquement (**Chatchatee et al. 2001, Vila et al. 2001, Järvinen et al. 2002**).

La première partie de ces travaux a consisté à évaluer chez des souris Ax et CV les réponses immunitaires induites par la sensibilisation par voie orale au lait de vache en présence de toxine cholérique. Pour cela, ces souris ont reçu une administration par semaine de ce mélange pendant 5 semaines (GF-Milk et CV-Milk). Les souris Ax et CV des lots contrôles ont reçu une solution saline (GF-Ctrl et CV-Ctrl). Les effets de la sensibilisation ont été mesurés à partir de l'analyse des échantillons sanguins et fécaux prélevés au cours de l'étude ainsi que celle de la production de cytokines par les splénocytes réactivés *in vitro* en présence de BLG ou CAS.

La deuxième partie de ces travaux a consisté à évaluer l'impact d'une colonisation bactérienne tardive du tractus digestif sur les réponses immunitaires induites par une sensibilisation orale aux protéines du lait de vache. Pour cela, des souris axéniques âgées de 6 semaines ont été conventionnalisées *via* l'inoculation par voie orale d'une solution préparée à partir d'un pool d'échantillons fécaux provenant des souris CV contrôles. Les souris Ax ainsi conventionnalisées sont nommées CVD. Les souris CV et CVD ont ensuite été sensibilisées et les effets ont été analysés dans les mêmes conditions que dans la première partie de l'étude.

## **II.3. PRINCIPAUX RÉSULTATS ET CONCLUSIONS**

Nous avons dans un premier temps analysé les effets de la sensibilisation expérimentale par voie orale aux allergènes majeurs du lait de vache en présence de toxine cholérique.

Les résultats de notre étude montrent que cette sensibilisation expérimentale induit des réponses IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de la  $\beta$ LG, plus fortes chez les souris Ax comparées aux souris CV. Par contre, les réponses IgE dirigées contre la CAS mais qui sont significativement plus fortes que chez les lots contrôles, sont similaires chez les souris Ax et CV.

Il est important de noter que ce modèle de sensibilisation par voie orale en présence d'adjuvant permet la mise en évidence des propriétés allergéniques de certaines protéines formant la fraction caséine avec l'induction d'une réponse IgE dirigée uniquement contre les caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2 chez les souris Ax et CV. Il permet également de confirmer les propriétés immunogéniques intrinsèques des caséines  $\kappa$  et  $\alpha$ S1 avec l'observation de réponses IgG1 spécifiques plus importantes chez les souris GF par rapport aux souris CV, comme dans l'étude précédente. Ce modèle nous a aussi permis de mettre en évidence le déséquilibre des réponses immunitaires observées chez les souris axéniques avec l'induction de réponses excessives non seulement de type Th2 (IgE et IgG1) mais aussi de type Th1 (IgG2a).

D'autre part, ces travaux préalables nous ont permis d'observer que la forte réponse IgE dirigée contre la BLG se produit de façon précoce (dès la troisième administration) alors que la réponse IgE dirigée contre la CAS n'augmente de façon significative qu'après la quatrième administration.

La deuxième partie de notre étude a permis d'étudier l'impact de la colonisation bactérienne du tractus digestif trois semaines après la période du sevrage sur la sensibilisation par voie orale aux protéines du lait de vache. L'analyse de la diversité du microbiote intestinal des souris CVd et des souris CV par une technique d'empreinte (TTGE) a montré que le microbiote de ces deux lots de souris présente une biodiversité similaire, illustrant ainsi que la conventionnalisation avait réellement eu lieu.

Dans un premier temps, jusqu'à la quatrième administration (lait de vache + toxine cholérique), l'analyse des réponses immunitaires induites indique que les souris CV et CVd présentent des profils de réponses dirigées contre la BLG moins intenses par rapport aux souris GF. Cependant, après la cinquième et dernière administration, le niveau des réponses

anticorps sériques spécifiques de la BLG augmente chez les souris CVd et les différences significatives observées avec les souris GF disparaissent, tandis que celles entre les souris GF et CV sont maintenues.

Les résultats de notre étude montrent de façon globale que la sensibilisation orale à la BLG et à la CAS est modulée différemment en fonction de la présence du microbiote intestinal qui joue un rôle protecteur dans ces conditions expérimentales, en particulier pour la BLG qui induit rapidement une réponse IgE.

La colonisation tardive du tractus gastro-intestinal à 6 semaines résulte en une altération persistante des fonctions immunitaires de l'hôte en réponse à la sensibilisation orale aux protéines du lait de vache, malgré l'observation d'effet correcteur partiel au niveau local (IgA fécales et cytokines sécrétées par les cellules issues des ganglions mésentériques).

L'ensemble de ces résultats montre que ce modèle de sensibilisation par voie orale en présence d'adjuvant induit la production d'IgE spécifiques des caséines. D'autre part, ces résultats soulignent l'importance du moment de la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal et suggèrent qu'elle devrait survenir de façon plus précoce pour prévenir le développement de réponses immunitaires excessives. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre cette étude en conventionnalisant des souris axéniques au moment de leur sevrage. La caractérisation du microbiote intestinal sera également effectuée de façon plus fine afin d'avoir plus d'informations concernant la composition. En effet, la caractérisation par TTGE du microbiote fécal est certainement très insuffisante pour détecter des différences de composition plus fines qui auraient pu survenir entre les souris conventionnelles et conventionnalisées.

**Delayed bacterial colonization of the gut alters the host immune response to oral sensitization against cow's milk proteins**

**Stéphanie Morin<sup>1</sup>, Romy Fischer<sup>1</sup>, Laetitia Przybylski-Nicaise<sup>1</sup>, Hervé Bernard<sup>1</sup>, Gérard Corthier<sup>2</sup>, Sylvie Rabort<sup>2</sup>, Jean-Michel Wal<sup>1</sup> and Stéphane Hazebrouck<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> INRA, UR 496 - Immuno-Allergie Alimentaire, CEA/iBiTec-S/SPI, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette

<sup>2</sup> INRA, UMR 1319 - Micalis, 78352 Jouy-en-Josas, France

**Correspondence:** Dr. Stéphane Hazebrouck, Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, INRA, iBiTec-S, SPI-Bât. 136, CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France.

**Fax:** +33-1-69-08-59-07

**E-mail:** stephane.hazebrouck@cea.fr

**Abbreviations:** **BLG**,  $\beta$ -lactoglobulin; **CAS**, whole casein fraction; **CMA**, cow's milk allergy; **CMP**, cow's milk protein; **GF**, germ-free; **CV**, conventional; **CVd**, conventionalized; **UHT**, ultra high temperature

**Keywords:** Allergen/ $\beta$ -lactoglobulin/Casein/Germ-free/Gut microbiota/Mouse

### **Abstract**

**Scope:** Cow's milk allergy is the most prevalent food allergy in infants whose immune system development is critically stimulated during postnatal gut colonization by commensal bacteria. Allergenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and caseins (CAS) was investigated in germ-free (GF) BALB/c mice and in GF mice conventionalized (CVd) at six weeks of age.

**Methods and results:** Oral sensitization to cow's milk in the presence of cholera toxin led to higher BLG-specific IgE, IgG1 and IgG2a responses in GF mice than in conventional (CV) mice. No significant difference was observed for CAS-specific IgE responses although IgG1 responses to  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins were higher in GF mice than in CV mice. CVd mice, orally inoculated with fecal preparations from CV mice, also displayed biased antibody responses compared to CV mice. Secretion of Th2 cytokines by BLG- and CAS-reactivated splenocytes of CVd mice was similar to that of GF mice whereas cytokine production by reactivated cells from mesenteric lymph nodes of CVd mice was equivalent to that of CV mice.

**Conclusions:** Oral sensitization to BLG and CAS was differentially affected by the absence of gut microbiota and delayed bacterial colonization altered persistently the host immune response to oral sensitization against food antigens.

## 1 Introduction

Prevalence of IgE-mediated food allergy is currently increasing in Western countries and affects up to 5% of young children [1]. Allergy to cow's milk, generally the first food introduced into the infant's diet, is the most common food allergy in the first year of life, affecting 1 to 3% of infants [1, 2]. Although cow's milk allergy (CMA) usually resolves by the age of 4 years, it increases the risk to develop allergic asthma, atopic eczema or egg allergy [3]. CMA is characterized by the development of an IgE response toward several cow's milk proteins (CMP). The major allergens of cow's milk are  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) and  $\alpha$ -lactalbumin from the whey fraction and  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins from the whole casein (CAS) fraction [4].

The hygiene hypothesis suggests that the increasing prevalence of allergic and inflammatory diseases in Western countries is related to excessive cleanliness and diminished exposure to microbes [5, 6]. Bacterial gut colonization, which is a major stimulus for the development and the homeostasis of the gut immune system, is thereby altered [7]. Delayed bacterial colonization of the gut has been reported in Western infants and a reduced diversity in the composition of early gut microbiota has been observed in allergic children in comparison with healthy children [8-10].

The critical role of the gut microbiota has also been evidenced in germ-free (GF) mice, which display immature mucosal and systemic lymphoid tissues [7, 11]. GF mice have been shown to develop Th2-biased immune responses [12-14] and to display defective immunosuppressive functions [14-16]. In a previous work, the propensity of GF mice to develop higher antibody responses than conventional (CV) mice was used to evaluate the

intrinsic allergenic and immunogenic potential of BLG and CAS by performing intraperitoneal administrations without adjuvant [17]. However, the absence of IgE response against CAS suggested that this mode of administration was inadequate for studying the allergenic potential of CAS. In this regard, oral route appears to be the most relevant route for administering food antigens. However, it generally leads to the induction of oral tolerance. Therefore the use of an adjuvant is required to abrogate oral tolerance induction. In this regard, cholera toxin (CT) has been successfully used to orally sensitize CV mice to CMP [18, 19] and to sensitize GF mice to whey proteins or ovalbumin [13, 20].

In the present work, the allergenic and immunogenic properties of BLG, CAS and  $\alpha$ -lactalbumin were evaluated in GF and CV mice. In order to address the effect of the food matrix while preserving the sterility of GF mice, we used ultra-high-temperature (UHT) sterilized milk to perform oral sensitization. It is also noteworthy that baked milk proteins have been associated with severe and persistent milk allergy in children [21]. In addition, we investigated the impact of delayed gut colonization by commensal bacteria on the host immune reactivity to oral sensitization against CMP.



## 2 Materials and methods

### 2.1 Media and reagents

UHT-sterilized unskimmed cow's milk (Candia, Paris, France) and cholera toxin (CT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were used for oral sensitization of mice. Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco, BD, Le Pont de Claix, France) was used for the preparation of fresh fecal suspensions. CMP were isolated, purified and characterized, as previously described [22].

### 2.2 Animals and housing conditions

Conventional SOPF female BALB/cByJ (Cv) mice were purchased from Charles River Laboratories (CRL, l'Arbresle, France) and used after having checked the absence of milk protein in their diet. Germ-free BALB/cByJ (GF) mice were bred in the germ-free animal facilities of Anaxem (INRA, Jouy en Josas, France). GF mice were housed in sterile trexler-type isolators (Getinge-La Calhène, Vendôme, France). Autoclaved tap water and sterilized pelleted standard chow deprived of cow's milk protein (R03-40, SAFE, Augy, France) were given *ad libitum*. The GF status was monitored by aerobic and anaerobic culture of feces and by microscopic examination of fecal preparations. All experiments were performed with permission 91-493 of French Veterinary Services.

### 2.3 Experimental protocols

In a first set of experiments, 7-week-old GF and CV mice (GF Milk and CV Milk, n=8/group) were orally sensitized on day 1, 8, 15, 22 and 29 with 200µl of cow's milk mixed with CT (10µg/mouse). Blood samples from the retro-orbital venous sinus and fecal samples were collected on day 20, 27 and 34. Control GF and CV mice (GF Ctrl and CV Ctrl; n=8/group) received saline buffer and were bled on the same days. The administration of CT alone has

been previously tested on CV and GF mice ([18] and preliminary results) and no signal specific to CMP has ever been detected. On day 41, spleens were collected for *in vitro* reactivation.

In a second set of experiments, 6 week-old GF mice were orally inoculated with a 1:100 dilution of fecal homogenate freshly prepared from CV mice. Mice received a second administration of fresh fecal suspension one week later. These conventionalized mice (CVd) and CV mice were housed in the same isolator for four weeks in order to assure optimal gut colonization by bacteria. On the day preceding the experimental sensitization, pooled feces from CVd and CV mice were collected and stored at -80°C for further characterization by PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE). Oral sensitization was then performed as described in the first experiment. Blood samples from the retro-orbital venous sinus and fecal samples were collected on day 26 and 36. On day 41, spleens and mesenteric lymph nodes (MLN) were collected for *in vitro* reactivation.

#### **2.4 DNA isolation, 16S rRNA gene amplification and TTGE fingerprinting**

Total DNA was extracted from individual feces as previously described [23]. Afterwards the V6-V8 region of 16S rRNA gene was amplified using the HotStar Master Mix Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The Dcode universal mutation detection system (Biorad, Paris, France) was used to separate PCR products according to their specific sequence (GC percentage) by TTGE. Electrophoresis was performed as described earlier [23]. Gels were stained with SYBR green I nucleic acid gel stain (Roche diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) and read on the Storm system (Molecular Dynamics). TTGE profiles were analyzed with the Gelcompar software program (version 2.2, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The analysis took into account the number of bands, their position on the gel, and their intensity. Similarity coefficients (Pearson correlation method) were calculated for each pair of profiles, yielding a

similarity matrix. A dendrogram was constructed from this matrix by performing an unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) algorithm [23, 24].

### **2.5 Quantification of specific antibodies in serum and feces**

Purified CMP were passively coated on plates (Nunc Immunoplate Maxisorp) and incubated overnight with appropriate dilutions of sera in EIA buffer (0.1M phosphate buffer, 0.1% BSA, 0.15M NaCl). Allergen-specific IgG1, IgG2a, IgA and IgE responses were evaluated as previously described [25]. Specific IgA responses were measured in fecal samples [26]. Results are reported as absorbance units (AU) at 414 nm.

### **2.6 Spleen and MLN cell culture and cytokine production**

At the end of experiments, four pools of two spleens were constituted per group of eight mice. Spleens were homogenized in RPMI-10 (RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 100U penicillin, 100µg/mL streptomycin). After lysis of red blood cells (180mM NH<sub>4</sub>Cl, 17mM Na<sub>2</sub>EDTA) splenocytes were resuspended in RPMI-10. In the second experiment, *in vitro* reactivation was also performed on MLN cells in order to compare systemic and local immune responses. Therefore, MLN from each group of mice were pooled and cells were resuspended in RPMI-10. Cells from spleen (10<sup>6</sup> cells/well) and MLN (5.10<sup>5</sup> cells/well) were incubated for 60h at 37°C (5%CO<sub>2</sub>) in 96-well culture plates in the presence of BLG (20µg/mL), CAS (20µg/mL) or Dulbecco's Phosphate –Buffered Saline (D-PBS, Life-Technologies, Paisley, UK) as negative control. Cytokine levels were assayed using CytoSets™ Kit (BioSource International Europe, Nivelles, Belgium) or BioPlex technology according to the manufacturer's recommendations (BioRad, Hercules, CA, USA). In the second experiment, in addition to Th1 and Th2 cytokines, the profile of cytokines measured was extended to IL-10 and IL-17. Results from splenocyte reactivation are expressed as mean ± SD.

## **2.7 Statistical analyses**

Data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test to compare the different groups. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 software and  $p < 0.05$  was considered significant ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.0001$ ). Data on cytokine secretions were analyzed using the unpaired t test.

### 3 Results

#### 3.1 Oral sensitization of GF and CV BALB/c mice to cow's milk.

##### 3.1.1 Antibody responses

Production of BLG-specific IgE and IgG1 was statistically significant in GF mice after the third milk administration (Fig. 1A). In contrast, BLG-specific IgE and IgG1 responses in CV mice were significant only after the fourth milk administration and were lower than those measured in GF mice. BLG-specific IgG2a and IgA antibodies were detected in GF mice whereas none was observed in CV mice. At the end of the experiment, BLG-specific IgE, IgG1, IgG2a and IgA responses were all significantly higher in GF mice than in CV mice. No production of specific antibodies was observed in sera from GF and CV control mice (data not shown).

In contrast, differences between GF and CV mice for CAS-specific antibody responses did not reach statistical significance (Fig. 1B). Compared to the BLG-specific IgE response, production of CAS-specific IgE antibodies was delayed in GF mice since it increased only after the fourth milk administration. It is also noteworthy that production of CAS-specific IgG2a and IgA was significant in GF mice only.

The final IgE and IgG1 responses against the four fractions of CAS were then determined (Fig.2). No significant difference between GF and CV mice was observed for CAS-specific IgE responses, which were directed only against  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-caseins (Fig. 2A). Production of IgG1 antibodies specific to  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-caseins was also not significantly different between GF and CV mice ( $p=0.13$  and  $0.23$ , respectively). No

significant production of  $\beta$ -casein-specific IgG1 was detected (Fig. 2B) but a significant production of  $\kappa$ -casein-specific IgG1 was evidenced in GF mice.

### **3.1.2 Cytokine production**

After BLG-reactivation of splenocytes, no significant difference between GF and CV mice was observed for the secretions of Th2-cytokines IL-4 and IL-5 or Th1-cytokine IFN- $\gamma$  (Fig. 3A). In contrast, secretion of IL-4 and IL-5 after CAS-reactivation was significantly higher in CV mice than in GF mice (Fig. 3B). Secretion of IFN- $\gamma$  after BLG- or CAS-reactivation was statistically significant only in CV mice (Fig. 3).

## **3.2 Impact of delayed gut colonization on the susceptibility of BALB/c mice to develop oral sensitization against cow's milk**

### **3.2.1 Conventionalization of GF mice**

As shown on Fig. 4, colonization of GF mice was successful as CV and CVd mice displayed comparable gut bacterial diversity. The TTGE banding patterns were compared in a single dendrogram that did not reveal any clustering according to the timing of gut bacterial colonization.

### **3.2.2 Antibody responses**

At first, CVd and CV mice seemed to be equally responsive to the protocol of sensitization in terms of BLG-specific antibody responses. Indeed, anti-BLG IgE, IgG1, IgG2a and IgA responses in CVd mice were similar to those found in CV mice and significantly lower than those in GF mice after the fourth milk administration (Fig. 5A). However, after the last milk administration, BLG-specific antibody responses in CVd mice were not anymore significantly

different from those observed in GF mice. IgG1 and IgA responses in CVd were even significantly higher than in CV mice. In addition, IgG1 and IgG2a responses against  $\alpha$ -lactalbumin, another whey protein, were higher in CVd than in CV mice (supplemental figure) but no IgE response was detected against  $\alpha$ -lactalbumin in any group of mice.

Production of  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -casein-specific IgG1 antibodies was significantly higher in CVd mice than in CV mice (Fig. 5B). Using the Mann-Whitney test, production of  $\alpha$ S1-casein-specific IgG1 in GF mice was also significantly higher than in CV mice ( $p=0.038$ ). No significant difference was evidenced between CAS-specific IgE responses from GF, CVd and CV mice (data not shown).

Fecal BLG- and  $\kappa$ -casein-specific IgA responses remained significantly lower in CVd and CV mice compared to GF mice, even after the last milk administration (Fig. 5C). On the contrary, fecal  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-casein-specific IgA responses in CVd mice were similar to those measured in GF mice and remained significantly higher than in CV mice.

### 3.2.3 Cytokine production

As observed previously, CAS-reactivation of splenocytes resulted in a higher production of Th2 cytokines (IL-5 and IL-13) and IL-10 in CV mice than in GF mice while BLG-reactivation did not reveal any significant difference, except for IL-13 production. In this case, reactivated splenocytes from CVd mice displayed a pattern of cytokine secretion very similar to the one observed in GF mice. No significant differences were evidenced for the production of IFN- $\gamma$  and IL-17. In contrast, reactivation of pooled MLN cells resulted in a totally different profile of cytokine production. Secretion of Th2 cytokines was higher in GF mice than in CV mice, after both BLG- and CAS-reactivation. Reactivated MLN cells from CVd mice exhibited a pattern of cytokine secretion comparable to the one observed in CV mice. Production of IL-17 and IFN- $\gamma$  was also higher in CV and CVd mice than in GF mice.

#### 4. Discussion

In contrast to BLG, i.p. administrations of CAS without adjuvant did not induce specific IgE antibodies in GF BALB/c mice [17]. In this work, GF mice were sensitized *via* the oral route with cow's milk in order to compare the immunogenic and allergenic potential of BLG, CAS and  $\alpha$ -lactalbumin in presence of the whole food matrix.

Despite the use of CT as adjuvant, specific IgE responses were restricted to a limited number of CMP. In addition to BLG, specific IgE antibodies were produced only against  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-caseins whereas no IgE response was detected toward  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. The susceptibility of GF mice to the allergenic properties of BLG and  $\alpha$ S1-casein is in good agreement with prevalence data since BLG and  $\alpha$ S1-casein have been reported to induce the highest specific IgE response in CM-allergic infants [27]. It is nevertheless noteworthy that the production of specific IgE antibodies was detected only against caseins that share the lowest level of identity with their murine counterparts. Indeed, sequences of bovine  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins display a percentage of identity of 19%, 21%, 36% and 33% with the corresponding murine homologues.

As expected, GF mice exhibited Th2-biased antibody responses with higher BLG-specific IgE and IgG1 levels than CV mice. However, in contrast with previous results obtained after intraperitoneal injections of BLG [12, 17], oral administrations of cow's milk to GF mice also led to higher levels of BLG-specific IgG2a than in CV mice. In the same way, production of  $\alpha$ -lactalbumin-specific IgG2a antibodies was higher in GF mice while CAS-specific IgG2a response was significant only in GF mice. Thus, whereas sensitization *via* i.p. route showed Th2-biased antibody responses in GF mice, sensitization *via* the oral route evidenced a general hyperresponsiveness of GF mice with both excessive Th2 and Th1 serum



antibody responses to dietary antigens. Similarly, Tsuda *et al* reported the role of intestinal commensal bacteria in transgenic BALB/c OVA23-3 mice for the down-regulation of both Th2 and Th1 antibody productions in response to an ovalbumin-containing diet [14].

Surprisingly, the early and strong BLG-specific IgE response in GF mice was not accompanied with higher levels of CAS-specific IgE antibodies in GF mice compared to CV mice. This fact suggests that IgE responses toward BLG or CAS resulted from two different mechanisms of sensitization, the one involved in BLG sensitization being more efficient in GF mice than in CV mice. In this regard, Roth-Walter *et al* reported that soluble BLG can be transcytosed through enterocytes while uptake of insoluble CAS or aggregated BLG occurs in Peyer's patches [28]. Although UHT milk was used in order to preserve the sterility of germ-free mice, 2% to 10% of the BLG retained its native conformation and thereby its solubility [29, 30]. The allergenic potential of BLG may thus be enhanced in GF mice because of the capacity of the residual soluble BLG to be transcytosed through enterocytes. Furthermore, as development of Peyer's patches in GF mice is impaired because of the absence of gut microbiota [31], sensitization to CAS *via* uptake through Peyer's patches may be less efficient in GF mice than in CV mice. Accordingly, production of Th2 cytokines by CAS-reactivated splenocytes was significantly higher in CV mice than in GF mice. However, Th2-cytokine secretion in reactivated splenocytes was associated with a higher level of IgE antibodies in GF mice than in CV mice. Indeed, similar IL-4 and IL-5 production in BLG-reactivated splenocytes of GF and CV mice correlated with higher BLG-specific IgE responses in GF mice compared to CV mice. In the same way, equivalent CAS-specific IgE responses in GF and CV mice correlated with lower IL-4 and IL-5 production in CAS-reactivated splenocytes of GF mice. Nevertheless, IgG1 responses toward  $\kappa$ - and  $\alpha$ S1-caseins remained significantly higher in GF mice than in CV mice, thus confirming their strong intrinsic immunogenicity as previously reported after i.p. administrations without adjuvant [17].

Conventionalization of GF mice was performed three weeks after weaning in order to determine whether hyperresponsiveness of GF BALB/c mice to oral sensitization could be modulated after a delayed acquisition of gut microbiota. Indeed, Herbst *et al* reported that exposure of adult GF C57BL/6 mice to a complex commensal microbiota is effective at reversing elevated IgE production induced by i.p. injections of ovalbumin [32]. Similarly, Rodriguez *et al.* described that GF C3H mice colonized with an infant gut microbiota at weaning age were protected from excessive BLG-specific IgG1 response although no difference in the BLG-specific IgE response was evidenced between GF, CVd and CV mice [33]. These results suggest that even late acquisition of a complex gut microbiota could be sufficient to protect mice from the development of allergic responses. However, bacterial stimulation of the immune system during the early postnatal life is considered to be critical for the proper development of immunoregulatory mechanisms, as postulated by the hygiene hypothesis. In this regard, two recent studies showed that the absence of proper host-microbe interaction during the first weeks of life can permanently change the immune profiles of mice and may thus alter the immune system reactivity [34, 35]. Accordingly, in the present work, CVd mice were likely affected by the lack of bacterial stimulation during postnatal period since they remained more responsive to experimental sensitization than CV mice. Time-course of antibody responses revealed nevertheless that CVd mice seemed at first more resistant than GF mice to the development of antibody responses against CMP. Moreover, some local immune responses in CVd mice such as the fecal BLG- and  $\kappa$ -casein-specific IgA responses were similar to those measured in CV mice. Cytokine productions in reactivated MLN cells of CVd and CV mice were also similar although they were significantly different in reactivated splenocytes. Interestingly, Hansen *et al.* reported that distribution of several mononuclear cell populations was differentially altered in MLN and spleen by a GF postnatal period [34]. In that study, higher relative amounts of NK cells, NKT cells or IFN- $\gamma$  producing

T cells were detected in spleens, but not in MLN, of both GF and CVd mice compared to CV mice.

In conclusion, GF mice orally sensitized to CMP were significantly more responsive to the allergenic potential of BLG than CV mice. In contrast, no significant difference was observed between GF and CV mice for the CAS-specific IgE response, although  $\alpha$ S1- and  $\kappa$ -caseins were more immunogenic in GF mice. The mechanisms leading to oral sensitization to BLG and CAS are thus probably differentially affected by the absence of gut microbiota. In addition, the delayed acquisition of gut microbiota by GF BALB/c mice persistently affected the reactivity of their immune system and altered systemic and local responses toward the major CM allergens. Further studies are required to elucidate the mechanisms by which gut microbiota affects the proper maturation of the host immune system. In this regard, studies based on the use of gnotobiotic mice should take carefully into consideration the timing of bacterial inoculation, at birth, weaning or during adulthood.

*We thank Benoit Lignon-Couffon and Pascal Guillaume for careful breeding of germ-free mice; Anne Foussier, Laura Boschhat, Aurelia Bruneau and Sandrine Ah-Leung for skilled technical assistance. Stephanie Morin is recipient of a grant from the department of Alimentation Humaine (AlimH, INRA, France).*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125, S116-S125.
- [2] Branum, A. M., Lukacs, S. L., Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 2009, 124, 1549-1555.
- [3] Saarinen, K. M., Pelkonen, A. S., Makela, M. J., Savilahti, E., Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 116, 869-875.
- [4] Wal, J. M., Cow's milk allergens. *Allergy.* 1998, 53, 1013-1022.
- [5] Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J. F., The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin.Exp.Immunol.* 2010, 160, 1-9.
- [6] Strachan, D. P., Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989, 299, 1259-1260.
- [7] Lee, Y. K., Mazmanian, S. K., Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010, 330, 1768-1773.
- [8] Adlerberth, I., Wold, A. E., Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009, 98, 229-238.
- [9] Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A. J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., et al., [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol.Clin.Biol.* 2007, 31, 533-542.
- [10] Wang, M., Karlsson, C., Olsson, C., Adlerberth, I., et al., Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2008, 121, 129-134.
- [11] Hooper, L. V., Littman, D. R., Macpherson, A. J., Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012, 336, 1268-1273.

- [12] Hazebrouck, S., Przybylski-Nicaise, L., Ah-Leung, S., Adel-Patient, K., et al., Allergic sensitization to bovine beta-lactoglobulin: comparison between germ-free and conventional BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009, 148, 65-72.
- [13] Rodriguez, B., Prioult, G., Bibiloni, R., Nicolis, I., et al., Germ-free status and altered caecal subdominant microbiota are associated with a high susceptibility to cow's milk allergy in mice. *FEMS Microbiol.Ecol.* 2011, 76, 133-144.
- [14] Tsuda, M., Hosono, A., Yanagibashi, T., Kihara-Fujioka, M., et al., Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunol Lett.* 2010, 132, 45-52.
- [15] Ishikawa, H., Tanaka, K., Maeda, Y., Aiba, Y., et al., Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *Clin Exp Immunol.* 2008, 153, 127-135.
- [16] Ostman, S., Rask, C., Wold, A. E., Hultkrantz, S., Telemo, E., Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur.J Immunol.* 2006, 36, 2336-2346.
- [17] Morin, S., Bernard, H., Przybylski-Nicaise, L., Corthier, G., et al., Allergenic and immunogenic potential of cow's milk beta-lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Mol.Nutr.Food Res.* 2011, 55, 1700-1707.
- [18] Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., Wal, J. M., Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 2005, 60, 658-664.
- [19] Li, X. M., Schofield, B. H., Huang, C. K., Kleiner, G. I., Sampson, H. A., A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999, 103, 206-214.
- [20] Gaboriau-Routhiau, V., Moreau, M. C., Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Pediatr.Res.* 1996, 39, 625-629.
- [21] Kim, J. S., Nowak-Wegrzyn, A., Sicherer, S. H., Noone, S., et al., Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2011, 128, 125-131.
- [22] Blanc, F., Bernard, H., Alessandri, S., Bublin, M., et al., Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Mol Nutr Food Res.* 2008, 52 Suppl 2, S166-S175.

- [23] Gerard, P., Beguet, F., Lepercq, P., Rigottier-Gois, L., et al., Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiol.Ecol.* 2004, 47, 337-343.
- [24] Rousseau, C., Levenez, F., Fouqueray, C., Dore, J., et al., *Clostridium difficile* colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J.Clin.Microbiol.* 2011, 49, 858-865.
- [25] Adel-Patient, K., Creminon, C., Bernard, H., Clement, G., et al., Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine beta-lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice. *J Immunol Methods* 2000, 235, 21-32.
- [26] Hazebrouck, S., Przybylski-Nicaise, L., Ah-Leung, S., Adel-Patient, K., et al., Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine beta-lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine.* 2009, 27, 5800-5805.
- [27] Ruitter, B., Knol, E. F., van Neerven, R. J., Garssen, J., et al., Maintenance of tolerance to cow's milk in atopic individuals is characterized by high levels of specific immunoglobulin G4. *Clin Exp Allergy.* 2007, 37, 1103-1110.
- [28] Roth-Walter, F., Berin, M. C., Arnaboldi, P., Escalante, C. R., et al., Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy.* 2008, 63, 882-890.
- [29] Chen, W. L., Hwang, M. T., Liao, C. Y., Ho, J. C., et al., Beta-lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *J.Dairy Sci.* 2005, 88, 1618-1630.
- [30] Negroni, L., Bernard, H., Clement, G., Chatel, J. M., et al., Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods.* 1998, 220, 25-37.
- [31] Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., Lamarre, A., IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes.Infect.* 2001, 3, 1021-1035.
- [32] Herbst, T., Sichelstiel, A., Schar, C., Yadava, K., et al., Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2011, 184, 198-205.

- [33] Rodriguez, B., Prioult, G., Hacini-Rachinel, F., Moine, D., et al., Infant gut microbiota is protective against cow's milk allergy in mice despite immature ileal T-cell response. *FEMS Microbiol.Ecol.* 2012, 79, 192-202.
- [34] Hansen, C. H., Nielsen, D. S., Kverka, M., Zakostelska, Z., et al., Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS.One.* 2012, 7, e34043.
- [35] Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., et al., Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012, 336, 489-493.



### Figure legends

**Figure 1.** Time-course of specific antibody responses toward BLG (A) and CAS (B) in GF mice (open circles) and CV mice (closed circles) orally sensitized to cow's milk. Assays were performed as duplicate on sera from 8 mice/group. Sera were diluted 1:50 for IgE determination, 1:100 for IgG2a and IgA determination and 1:1000 for IgG1 determination. No specific antibody response was detected in control mice (see Section 2). Specific Ig levels were reported as Absorbance Units (AU) at 414 nm. Median and interquartile range were shown. GF Milk significantly different from CV Milk (Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ), GF Milk from GF Ctrl (° symbol) and CV Milk from CV Ctrl (# symbol).

**Figure 2.** Specific IgE (A) and IgG1 (B) responses toward the different fractions of caseins in GF mice (open symbols) and CV mice (black symbols) after the last administration of cow's milk (see Section 2). Assays were performed as duplicate on sera from 8 mice/group. Sera were diluted 1:1000. Specific antibody responses were reported as AUs at 414 nm and median was shown. GF Milk significantly different from CV Milk (Mann-Whitney test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ), GF Milk from GF Ctrl (° symbol) and CV Milk from CV Ctrl (# symbol).

**Figure 3.** Cytokine secretions by (A) BLG- or (B) CAS-reactivated splenocytes from mice orally sensitized to cow's milk (see section 2). Results are represented as cytokine secretions in supernatants of reactivated splenocytes after subtraction of cytokines assayed in supernatants of D-PBS-reactivated splenocytes, thus corresponding to specific production. Data were analyzed using the unpaired t test (\* $p < 0.05$ , mean+SD was shown).

**Figure 4.** TTGE fingerprinting profiles of 16S rRNA gene amplicons (obtained using primers for the V6-V8 region) of individual feces from CVd and CV mice on the day preceding oral sensitization to cow's milk (see Section 2).

**Figure 5.** Impact of delayed gut colonization on serum antibody responses toward BLG (A, on day 26 and 36) and  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins (B, on day 36) and on fecal IgA responses toward BLG,  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2- and  $\kappa$ -caseins (C, on day 26 and 36). GF mice (open circle), CVd mice (open diamonds) and CV mice (closed circles) were orally sensitized to cow's milk (see Section 2). Assays were performed as duplicate on sera from 8 mice/group. Specific antibody responses were reported as AUs at 414 nm. Median and interquartile range were shown. Data were analysed using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. Significant differences were indicated for GF Milk vs CV Milk (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ), for CVd Milk vs CV Milk (<sup>b</sup> $p < 0.05$ ) and for GF Milk vs CVd Milk (<sup>c</sup> $p < 0.05$ ).

**Figure 6.** Cytokine secretions by BLG- or CAS-reactivated splenocytes (A) and MLN cells (B) from mice orally sensitized to cow's milk (see Section 2). Results are represented as cytokine secretions in supernatants of reactivated cells after subtraction of cytokines assayed in supernatants of D-PBS-reactivated cells, thus corresponding to specific production. Data on reactivated splenocytes were analyzed using the unpaired t test ( $*p < 0.05$ , mean+SD was shown). No statistical analysis was performed on data obtained with pooled MLN cells of 8 mice/group.

Figure 1:

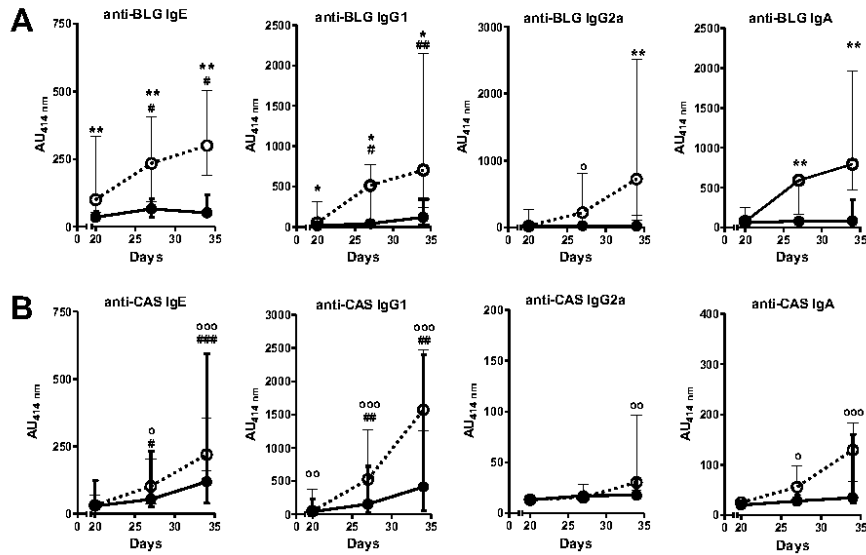


Figure 2:

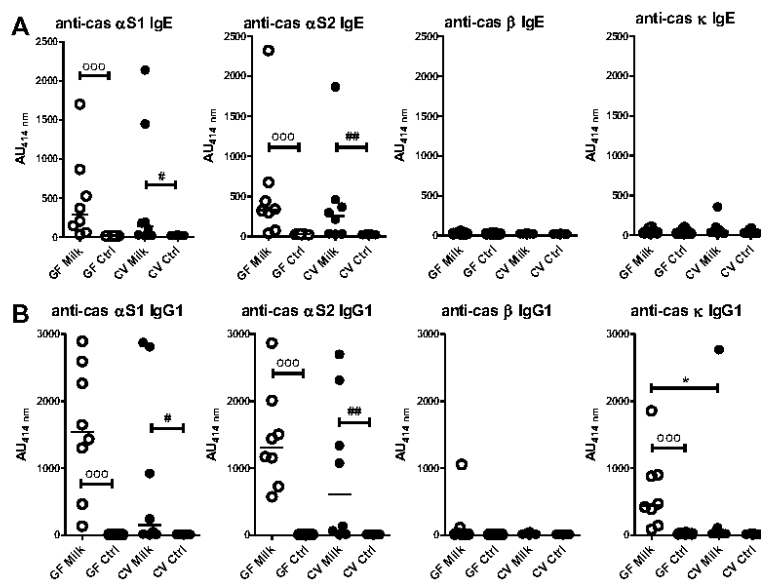


Figure 3:

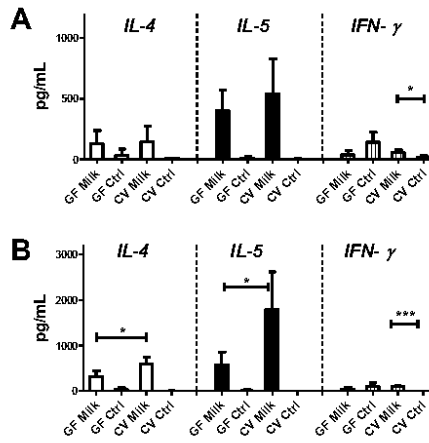


Figure 4:

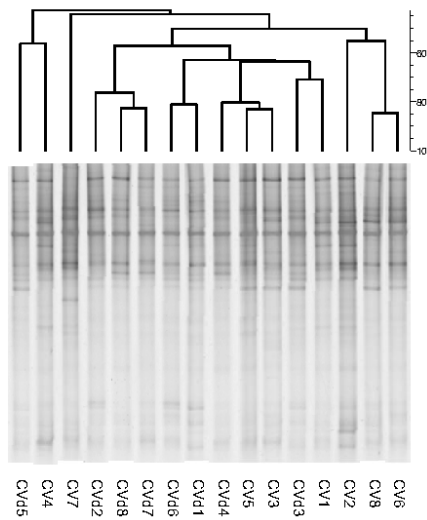


Figure 5:

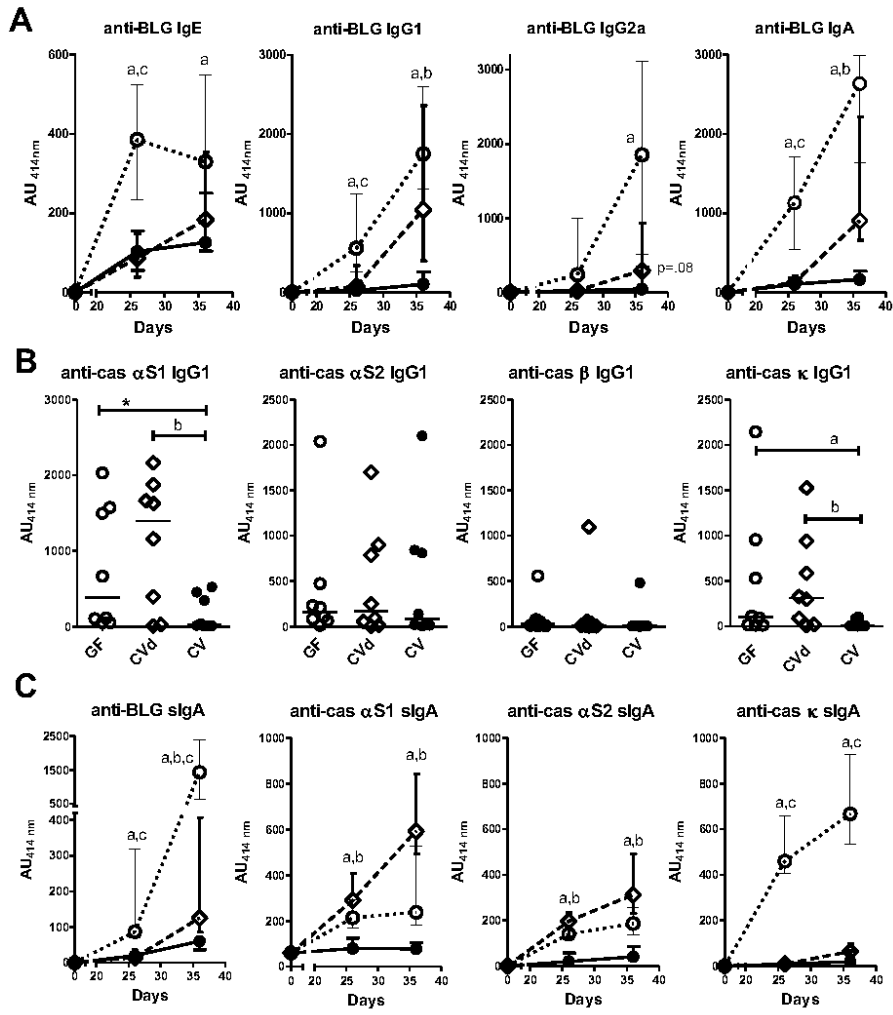
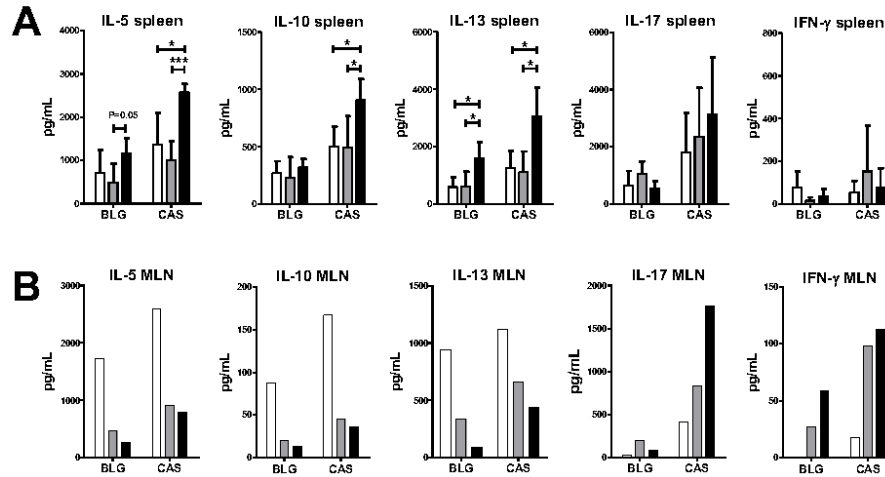
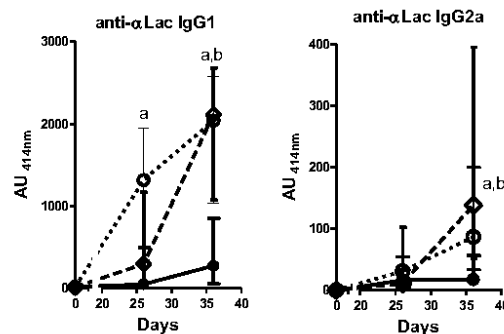


Figure 6:



Supplemental Figure:



Impact of delayed gut colonization on IgG1 and IgG2a responses toward  $\alpha$ -lactalbumin. GF mice (open circle), CVd mice (open diamonds) and CV mice (closed circles) were orally sensitized to cow's milk (see Section 2). Assays were performed as duplicate on sera from 8 mice/group. Specific antibody responses were reported as AUs at 414 nm. Median and interquartile range were shown. Data were analysed using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. Significant differences were indicated for GF Milk vs CV Milk (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ), for CVd Milk vs CV Milk (<sup>b</sup> $p < 0.05$ ) and for GF Milk vs CVd Milk (<sup>c</sup> $p < 0.05$ ).

# III. IMPACT DE LA COLONISATION DU TRACTUS DIGESTIF AU MOMENT DU SEVRAGE SUR LA SENSIBILISATION AU LAIT DE VACHE

---

## III.1. INTRODUCTION

Nous avons observé lors de l'étude précédente, que la conventionnalisation de souris axéniques âgées de 6 semaines ne permet pas de corriger complètement le biais des réponses immunes observées chez les souris axéniques après une sensibilisation par voie orale au lait de vache en présence de toxine cholérique (Morin et al. 2012). Ces résultats sont en accord avec les données qui suggèrent que l'établissement d'un microbiote intestinal au cours des périodes précoces du développement est associé à un meilleur état de santé au cours de la vie (**Isolauri 2012**). La conventionnalisation du tractus gastro-intestinal doit donc certainement être réalisée à une période plus précoce pour essayer de prévenir les dérèglements du système immunitaire. Dans cette étude, nous avons évalué si une colonisation du tube digestif immédiatement après le sevrage pouvait permettre de rétablir une réactivité du système immunitaire des souris conventionnalisées (CVd) comparable à celle observée chez les souris conventionnelles. La période du sevrage correspond en effet à un stade critique et décisif dans les processus d'établissement du microbiote intestinal et de maturation du tractus gastro-intestinal. La diversification du régime alimentaire apporte de nouveaux éléments exogènes capables de moduler la composition du microbiote intestinal mais aussi de stimuler la maturation du tractus gastro-intestinal (**Menezes et al. 2003**).

Les objectifs de cette étude ont donc été de déterminer l'impact de la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal de souris axéniques au moment du sevrage sur le développement ultérieur d'une sensibilisation aux protéines du lait de vache.

## **III.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **III.2.1. Milieux et réactifs**

Le milieu BHI (Brain Heart Infusion broth, Difco, BD, Le Pont de Claix, France) a été utilisé afin de diluer les fèces pour la préparation des solutions fécales utilisées lors de la conventionalisation.

Le lait de vache entier stérilisé UHT (Ultra High Temperature, GrandLait Candia, Paris, France) et la toxine cholérique (CT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) ont été utilisés pour la sensibilisation expérimentale par voie orale.

Les protéines du lait de vache (caséines,  $\alpha$ -lactalbumine et BLG) ont été isolées, purifiées et caractérisées dans les conditions préalablement décrites (**Blanc et al. 2008**).

### **III.2.2. Souris : Origine et conditions d'élevage**

Les souris utilisées sont des femelles de souche BALB/cByJ. Les souris conventionnelles (CV) sont des souris SPF (Specific Pathogen Free) provenant du centre d'élevage René Janvier (Le Genest Saint-Isle, France). Les souris axéniques (Ax) proviennent de l'animalerie gnotoxénique Anaxem de l'Institut MICALIS (INRA, Jouy en Josas, France). Toutes les souris reçoivent à volonté de l'eau stérile autoclavée et de la nourriture dépourvue en protéines de lait de vache (R03, SAFE, Augy, France), stérilisée par irradiation (IBA Mediris, Fleurus, Belgique).

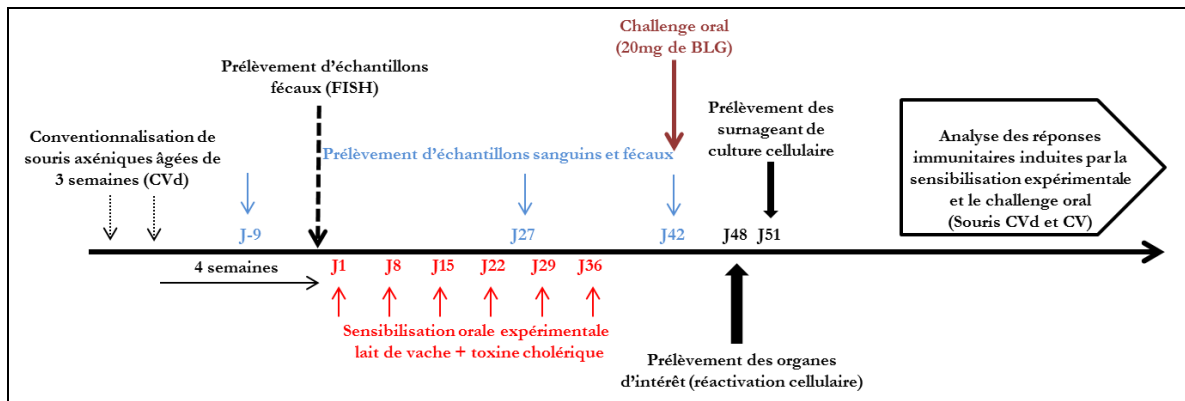
### **III.2.3. Protocole expérimental**

Un lot de 10 souris Ax âgées de 3 semaines a été conventionnalisé au moment du sevrage *via* l'inoculation par voie orale d'une solution préparée à partir d'un pool d'échantillons fécaux provenant des souris CV (n=10) de l'étude. Les souris axéniques ainsi conventionnalisées (CVd) ont été placées dans le même isolateur que les souris CV après l'inoculation. Une deuxième inoculation a été réalisée une semaine après, afin de favoriser l'implantation des bactéries anaérobies au niveau du tractus digestif. Des échantillons fécaux



ont été prélevés un jour avant le début du protocole de sensibilisation (J-1) afin d'analyser la composition du microbiote intestinal par la technique d'hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux (FISH).

La sensibilisation expérimentale a débuté 4 semaines après la première inoculation afin de permettre une colonisation optimale du tractus digestif des souris et aussi afin de permettre l'établissement des interactions entre les bactéries et l'hôte. Elle a été réalisée dans les mêmes conditions que dans l'étude précédente avec une administration orale en plus (6 administrations de lait de vache (200µl par voie orale en présence de toxine cholérique (10µg/souris) à J1, 8, 15, 22, 29 et 36) afin de s'assurer une production finale d'IgE plus élevée chez les souris conventionnelles (**Figure 24**).



**Figure 24: Protocole expérimental**

Une semaine après le dernier gavage (J42), un challenge oral a été réalisé par gavage intragastrique de 20mg de BLG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). La température corporelle des souris a été mesurée au niveau du rectum 15 et 30 min après le challenge. Un dosage des mMCP-1 (mouse Mast Cell Protease 1) a également été effectué dans les échantillons sanguins prélevés après la dernière prise de température.

Afin d'analyser la réponse immunitaire provoquée par la sensibilisation expérimentale, des prélèvements d'échantillons sanguins et fécaux ont été effectués, comme précédemment décrit (**Morin et al. 2011**), chez toutes les souris, avant, pendant la sensibilisation et le jour du challenge oral (J-9, J26 et J42).

Les organes d'intérêt (rate et ganglions mésentériques) ont été prélevés le jour du sacrifice des souris (J48) afin remettre en culture les cellules issues de ces organes en présence d'activateur (réactivation *in vitro*).

Les différentes manipulations sur les souris ont été effectuées selon la réglementation en vigueur suivant les recommandations européennes (Council directives on the protection of animals for experimental and other scientific purposes. J. Off. Communautés Européennes, 86/609/EEC), à l'aide d'un chercheur habilité (Stéphane Hazebrouck, autorisation à expérimenter n° 91-243).

### **III.2.4. Hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux (FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization)**

Cette analyse est réalisée à partir d'échantillons fécaux dilués dans du paraformaldéhyde (PFA, 3%) au moment du prélèvement. Après 24 heures de fixation à 4°C, ces échantillons sont congelés à -80°C.

Avant l'étape d'hybridation, les échantillons sont dilués dans du tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline : NaCl 130mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 7mM, pH 7,2) et sont centrifugés (9000g, 3 min, température ambiante). Le culot est remis en suspension dans 1mL de tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 100mM, pH 8, EDTA 50mM). Les échantillons sont ensuite centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment. Les culots ainsi obtenus sont remis en suspension dans du tampon Tris-EDTA contenant 1mg/mL de lysosyme (Serva, Heildelberg, Allemagne). Après une incubation pendant 10 min à température ambiante permettant la perméabilisation des cellules bactériennes, une étape de lavage en PBS est nécessaire pour éliminer le lysosyme.

Les échantillons sont ensuite remis en suspension dans le tampon d'hybridation (NaCl 900mM, Tris-HCl 20mM, pH 7,2 ; SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0,01% ; formamide 15%). Les échantillons ainsi préparés sont distribués sur plaques 96 puits (40µl/puits) avec 4ng/µL de sondes fluorescentes. L'hybridation est réalisée en plaçant les plaques à 35°C pendant toute la nuit.

Les sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARNr 16S bactérien utilisées pour notre analyse sont décrites dans le **Tableau 4**. Elles sont liées de façon covalente à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ou à l'indodicarbocyanine (Cy5) à leur extrémité 5' et proviennent de chez Thermo Electron (Ulm, Allemagne). La sonde Eub338 est spécifique du domaine des bactéries (**Amann et al. 1990**). Elle est utilisée comme contrôle positif.

La sonde NonEub 338 est le complément de la sonde Eub338, utilisée comme contrôle négatif afin d'évaluer les hybridations non spécifiques et d'éliminer le bruit de fond dû à la fluorescence (**Wallner, Amann and Beisker 1993**). Les autres sondes sont groupe-spécifiques sans hybridation croisée.

Suite à l'étape d'hybridation, 150µL de tampon d'hybridation sont ajoutés dans chaque puits et les cellules sont centrifugées à 4000g pendant 15 min à température ambiante. Les culots sont remis en suspension dans le tampon de lavage (NaCl 64mM, Tris-HCl 20mM, pH8, EDTA 5mM, SDS 0,01%). Les fixations non spécifiques des sondes sont éliminées par l'incubation des cellules pendant 20 min à 37°C suivie d'une centrifugation à 4000g pendant 15 min à température ambiante. Les culots obtenus sont ensuite remis en suspension dans du PBS.

Les échantillons ainsi obtenus sont dilués dans du FACS FLOW pour l'acquisition des données par cytométrie en flux (100µl d'échantillon pour 500µL de FACS FLOW, Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

L'acquisition des données est effectuée à l'aide du cytomètre en flux Facs Calibur (Becton Dickinson) selon la description de Rigottier-Gois *et al.* (**Rigottier-Gois et al. 2003**). La numération cellulaire est réalisée en combinant dans le même tube d'hybridation une sonde spécifique d'un groupe (Cy5) avec une sonde Eub338 (FITC). La proportion des cellules marquées avec la sonde spécifique du groupe est corrigée en enlevant le bruit de fond mesuré à l'aide de la sonde NonEub338 à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse CellQuest. Pour chaque sonde spécifique, les résultats sont exprimés sous forme de proportion relative par rapport aux bactéries totales s'hybridant avec la sonde Eub338.

Sondes	Séquences (5'→ 3')	Cibles	Fluoro-chromes	Références
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domaine Bactérie	5'FITC	(Amann et al. 1990)
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domaine Bactérie	5'CY5	(Amann et al. 1990)
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	Aucune	5'FITC	(Wallner et al. 1993)
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	Aucune	5'CY5	(Wallner et al. 1993)
Erec 482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	groupe <i>Clostridium coccoïdes</i>	5'CY5	(Franks et al. 1998)
Clep1156	GTTTTRTCAACGGCAGTC Compétiteur 1 GRTTTRTCAYCGGCAGTC* Compétiteur 2 GTVTTRTCBACGGCAGTC*	Sous-groupe <i>Clostridium leptum</i>	5'CY5	(Saunier et al. 2005)
Ato291	GGTCGGTCTCTCAACCC	cluster <i>Atopobium</i>	5'CY5	(Harmsen et al. 2000)
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	groupe <i>Bacteroides-Prevotella</i>	5'CY5	(Manz et al. 1996)
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	genre <i>Bifidobacterium</i>	5'CY5	(Langendijk et al. 1995)
Enter1432	CTTTTGCAACCCACT	Enterobacteries	5'CY5	(Sghir et al. 2000)
Ecy1387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	<i>Eubacterium cylindroides</i> , <i>Clostridium innocuum</i> , <i>Eubacterium bifforme</i> , <i>Eubacterium tortuosum</i> , <i>Eubacterium dolichum</i> et <i>Streptococcus pleomorphus</i>	5'CY5	(Harmsen et al. 2002)
Muc1437	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5'CY5	(Derrien et al. 2008)
MIB661	GCATTCCGCATACTTCTC	Mouse Intestinal Bacteria ( <i>Bacteroides</i> subgroup (cytophaga- <i>Flavobacter</i> - <i>Bacteroides</i> (CFB)))	5'CY5	(Salzman et al. 2002) (Kibe et al. 2007)
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	groupe <i>Lactobacillus</i> - <i>Enterococcus</i>	5'CY5	(HJ Harmsen 1999)
Str493	GTTAGCCGTCCCTTTCTGG	groupe <i>Streptococcus</i>	5'CY5	(Franks et al. 1998)
Cdif198 Cperf191	GGUGAGCCAGUACAGGAUGGA CAUCAUUAACCAAAGGAGC	<i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium perfringens</i>	5'CY5	(Fallani et al. 2006)

**Tableau 4: Définitions des séquences et des cibles des sondes utilisées pour la FISH**

\*Y = C/T ; R = G/A ; K = G/T ; M = C/A ; W = A/T ; B = C/G/T et V = G/C/A

### **III.2.5. Dosage des anticorps spécifiques dans les échantillons sanguins et fécaux**

Des protéines purifiées du lait de vache (BLG,  $\alpha$ -lactalbumine, CAS, caséine- $\alpha$ S1, - $\alpha$ S2, - $\beta$ , et-  $\kappa$ ) sont directement immobilisées de façon individuelle sur des plaques de microtitration (Nunc Immunoplate Maxisorp). La détection des anticorps spécifiques de l'allergène (IgG1, IgG2a, IgA et IgE) est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Adel-Patient et al. 2000). Les réponses IgA spécifiques de l'allergène sont également mesurées dans les échantillons fécaux (Hazebrouck et al. 2009a). Les résultats sont exprimés en unité d'absorbance (UA) à 414nm.

### **III.2.6. Dosage des protéases mastocytaires de type 1 (mouse Mast Cell Protease 1 (mMCP-1))**

Le dosage des mMCP-1 a été effectué à partir des échantillons sanguins prélevés avant la sensibilisation expérimentale (J-9) et après le challenge oral (J42) à l'aide d'un kit de dosage spécifique de type ELISA (mouse Mast Cell Protease ELISA kit, Moredun Scientific). Les échantillons dilués (1/100) ont été analysés selon les recommandations du fournisseur. La révélation des résultats est effectuée à l'aide d'un autre kit (TMB substrate, Bio-Rad), selon les recommandations du fournisseur.

### **III.2.7. Réactivation des cellules issues des rates et des ganglions mésentériques et dosage des cytokines**

Le sacrifice des souris est réalisé en fin d'expérimentation par dislocation cervicale. Les rates sont prélevées par lot de 2 souris et les ganglions mésentériques par lot de 5 souris. Les rates subissent une étape de lyse des érythrocytes (tampon de lyse :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  180mM ;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  17mM ; pH 7,2).

Les cellules issues des rates et des ganglions mésentériques sont gardées dans du milieu RPMI complet (RPMI 1640, L-glutamine 2 mM, Pénicilline 100 U, Streptomycine 100  $\mu\text{g}$ , Sérum de Veau Fœtal décomplémenté 10%, Invitrogen (Gibco)).

Une numération cellulaire et un test de viabilité sont réalisés en utilisant le réactif Viacount et le cytomètre de flux Guava EasyCyte Plus, selon les instructions fournies (Guava – Millipore).

Après ajustement à  $4,5 \cdot 10^6$  cellules/mL en milieu RPMI complet, les suspensions cellulaires sont distribuées sur des plaques 96 puits (225  $\mu$ L/puits). Les activateurs sont alors ajoutés (25  $\mu$ L/puits, 4 puits/activateur, BLG native et CAS, (20  $\mu$ g/mL final)). Des puits contrôles comportant du PBS stérile et de l'ovalbumine (Sigma, 20  $\mu$ g/ml final) ont également été préparés.

L'évaluation de la réponse cellulaire est effectuée par dosage ELISA sandwich des cytokines (IL-5, IFN- $\gamma$  et IL-17) sécrétées dans les surnageants de culture.

Les échantillons dilués (dilution en fonction de la cytokine analysée) sont distribués sur des plaques de microtitration contenant un anticorps de capture (anti-mouse/human IL-5 clone TRFK5, anti-mouse IFN- $\gamma$  clone XMG1.2 ou anti-mouse IL-17 clone eBio 17CK15A5, eBioscience). Après une incubation pendant une nuit à 4°C et un lavage (tampon phosphate de potassium 10mM, Tween 0,05%, pH 7,4), l'anticorps permettant la révélation de la présence des cytokines est ajouté (anti-IL-5-biotin clone TRFK4, anti-IFN- $\gamma$ -biotin clone R4-6A2 ou anti-IL-17-biotin clone IL-17A eBio 17B7, eBioscience). Après une incubation pendant une nuit à 4°C et un lavage, la streptavidine couplée à l'acétylcholinestérase est ajoutée pendant 1h30 avec agitation. L'activité enzymatique est révélée par la réaction colorimétrique d'Ellman (**Ellman et al. 1961**). Le dosage de l'IL-10 sera réalisé ultérieurement.

### **III.2.8. Analyses statistiques**

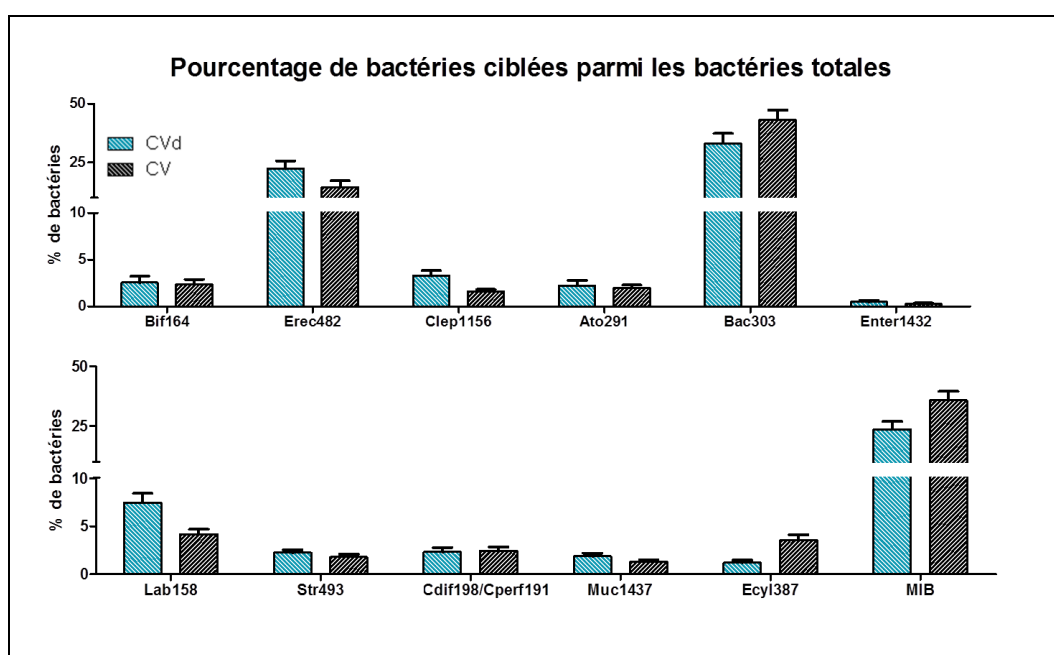
Les données sont analysées à l'aide du test statistique de Mann-Whitney ou du test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.01. Pour une valeur de  $p < 0,05$ , la différence est significative (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,0001$ ).

### III.3. RÉSULTATS

#### III.3.1. Analyse de la composition du microbiote fécal

Nous observons la présence des groupes bactériens ciblés à l'aide des 12 sondes spécifiques utilisées, aussi bien chez les souris CV que chez les souris CVd (**Figure 25**). Le **Tableau 5** rappelle les cibles des sondes utilisées.

L'analyse individuelle révèle des différences significatives au niveau des proportions retrouvées pour certains groupes bactériens (**Figure 26**).



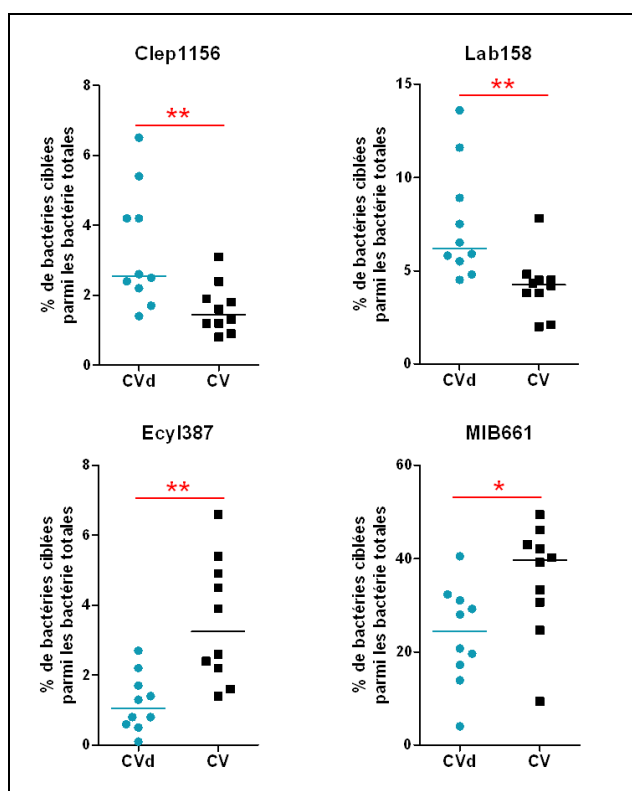
**Figure 25: Composition du microbiote fécal évaluée à l'aide de 12 sondes spécifiques**

Les souris CVd sont des souris axéniques conventionnalisées à l'âge de trois semaines *via* l'inoculation d'une préparation fécale provenant des souris CV. Les résultats présentent le pourcentage de bactéries détectées par les sondes parmi les bactéries totales. La moyenne  $\pm$  SEM est indiquée.

Le microbiote des souris CVd renferme un taux plus important de *Clostridium leptum* (sonde Clep1156) et de *Lactobacillus-Enterococcus* (sonde Lab158) et un taux moins important de *Clostridium*, *Eubacterium* et *Streptococcus* (sonde Ecy1387) ainsi que de Bactéroïdes (MIB661) par rapport à celui des souris CV.

Sondes	Cibles
Bif164	genre <i>Bifidobacterium</i>
Erec 482	groupe <i>Clostridium coccoïdes</i>
Clep1156	Sous-groupe <i>Clostridium leptum</i>
Ato291	cluster <i>Atopobium</i>
Bac303	groupe <i>Bacteroides-Prevotella</i>
Enter1432	Enterobactérie
Lab158	groupe <i>Lactobacillus-Enterococcus</i>
Str493	<i>Streptococcus/Lactococcus</i>
Cdif198	<i>Clostridium difficile</i>
Cper191	<i>Clostridium perfringens</i>
Ecy1387	<i>Eubacterium cylindroides</i> , <i>Clostridium innocuum</i> , <i>Eubacterium bifforme</i> , <i>Eubacterium tortuosum</i> , <i>Eubacterium dolichum</i> et <i>Streptococcus pleomorphus</i>
Muc1437	<i>Akkermansia muciniphila</i>
MIB661	Mouse Intestinal Bacteria (Bacteroides subgroup (cytophaga-Flavobacter-Bacteroides (CFB)))

**Tableau 5: Désignation des bactéries détectées à l'aide des sondes spécifiques**



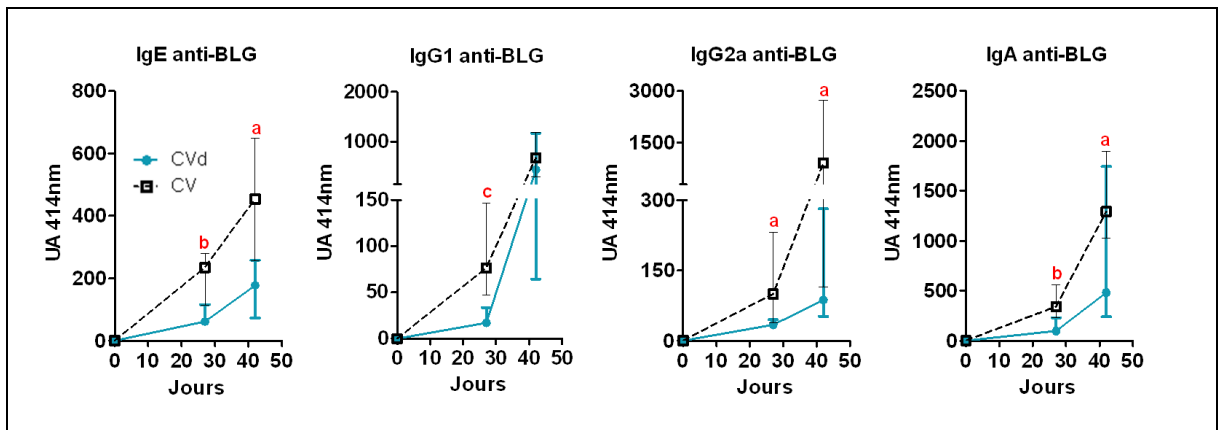
**Figure 26: Taux individuels de bactéries ciblées par les sondes Clep1156, Lab158, Ecy1387 et MIB661**

Les résultats présentent le pourcentage de bactéries détectées par les sondes Clep1156, (sous-groupe *Clostridium leptum*), Lab158, (groupe *Lactobacillus-Enterococcus*), Ecy1387, (*Eubacterium cylindroides*, *Clostridium innocuum*, *Eubacterium bifforme*, *Eubacterium tortuosum*, *Eubacterium dolichum* et *Streptococcus pleomorphus*) et MIB661 (Mouse Intestinal Bacteria (Bacteroides subgroup (cytophaga-Flavobacter-Bacteroides (CFB))) parmi les bactéries totales. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney. Les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ). La médiane est indiquée.



### III.3.2. Réponses anticorps induites par la sensibilisation expérimentale

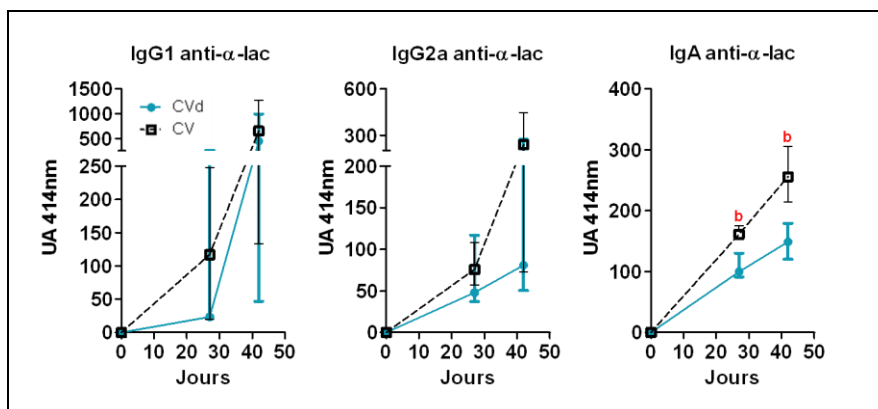
Nous constatons que le niveau de production des IgE, IgG2a et IgA sériques dirigés contre la BLG est significativement plus faible chez les souris CVd par rapport aux souris CV. La réponse IgG1 présente également une différence significative après la 4<sup>ème</sup> administration de lait de vache (**Figure 27**).



**Figure 27: Réponses anticorps spécifiques de la BLG (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/100 pour les IgA, 1/500 pour les IgG2a et 1/100 000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés en unité d'Absorbance (UA) à 414 nm (n=10). Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (a= p<0,05; b= p<0,001 et c= p<0,0001). La médiane (intervalle interquartile) est indiquée.

Les réponses IgG1 et IgG2a dirigées contre l' $\alpha$ -Lac ne présentent aucune différence significative entre les souris CVd et CV, alors que le niveau de production des IgA spécifiques de l' $\alpha$ -Lac est plus élevé chez les souris CV par rapport aux souris CVd, tout au long du protocole de sensibilisation expérimentale (**Figure 28**).

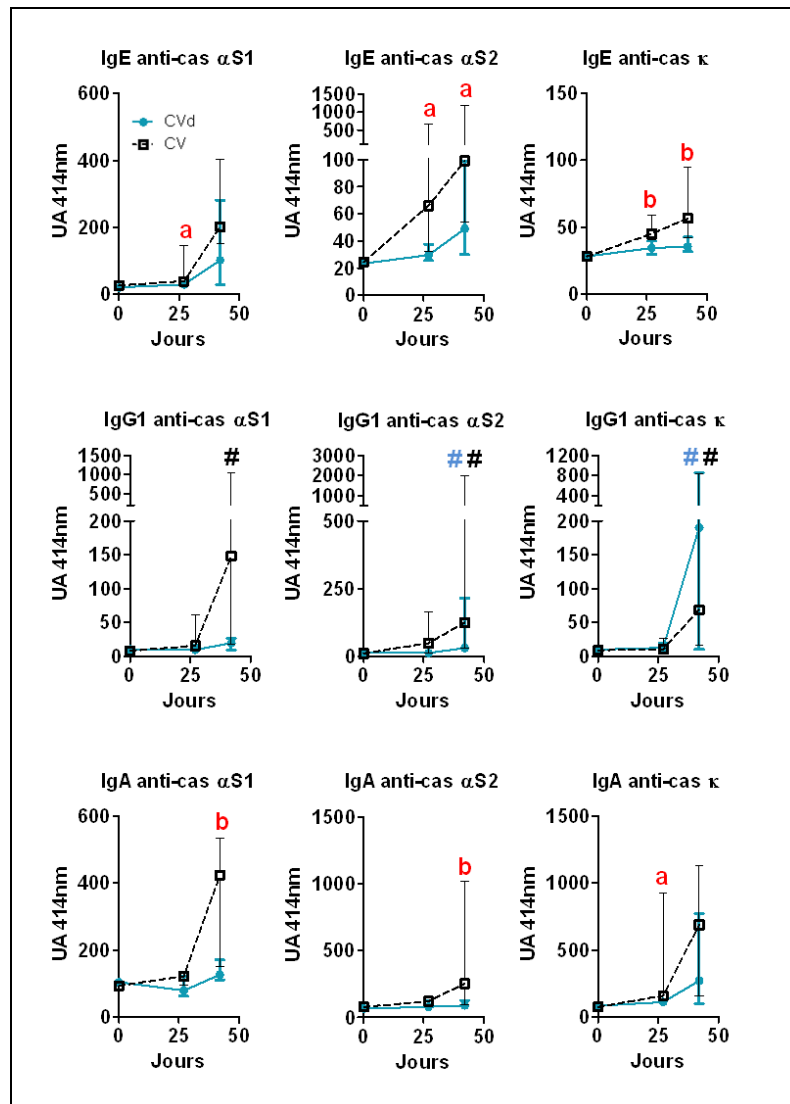


**Figure 28: Réponses anticorps spécifiques de l' $\alpha$ -lactalbumine (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/100 pour les IgG2a et les IgA et 1/10 000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés en unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney. Les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (b= p<0,001). La médiane (intervalle interquartile) est indiquée. Aucune réponse IgE spécifique de l' $\alpha$ -Lac n'a été mesurée (non montré).

La **Figure 29** présente les réponses anticorps dirigées contre les caséines  $\alpha$ S1  $\alpha$ S2 et  $\kappa$ . Les réponses dirigées contre la caséine  $\beta$  ont été mesurées ; cependant aucune réponse n'a été détectée (résultats non présentés).

Les réponses IgE spécifiques des caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2 sont plus fortes chez les souris CV par rapport aux souris CVd. On note également une faible production d'IgE spécifiques de la caséine  $\kappa$  mais néanmoins significativement plus élevée chez les souris CV.



**Figure 29: Réponses anticorps spécifiques des caséines (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosage diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/100 pour les IgG2a et les IgA et 1/10 000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés en unité d'Absorbance (UA) à 414 nm sous forme de médiane ; intervalle interquartile (n=10). Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney. Les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (a= p<0,05; b= p<0,001). Les différences significatives entre les mesures effectuées à J-9 (S0) et J42 (S2) sont notées # pour les souris CVd et # pour les souris CV. La médiane (intervalle interquartile) est indiquée.

Aucune différence significative n'a été observée au niveau des réponses IgG1 spécifiques des caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\kappa$  entre les souris CV et CVd à cause d'une très forte

variabilité interindividuelle. Toutefois, on observe par rapport à la saignée S0 contrôle (avant sensibilisation) une production significative d'IgG1 anti-caséines  $\alpha$ S1 uniquement chez les souris CV alors que pour les caséines  $\alpha$ S2 et  $\kappa$ , la production d'IgG1 spécifiques est significative chez les souris CVd et CV. Les réponses IgG2a anti-caséines ne présentent pas de différences notables (non montrées).

Les réponses IgA dirigées contre les caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2 sont significativement plus fortes chez les souris CV par rapport aux souris CVd. Cette différence est également observée pour la réponse contre la caséine  $\kappa$  seulement après la 4<sup>ème</sup> administration de lait.

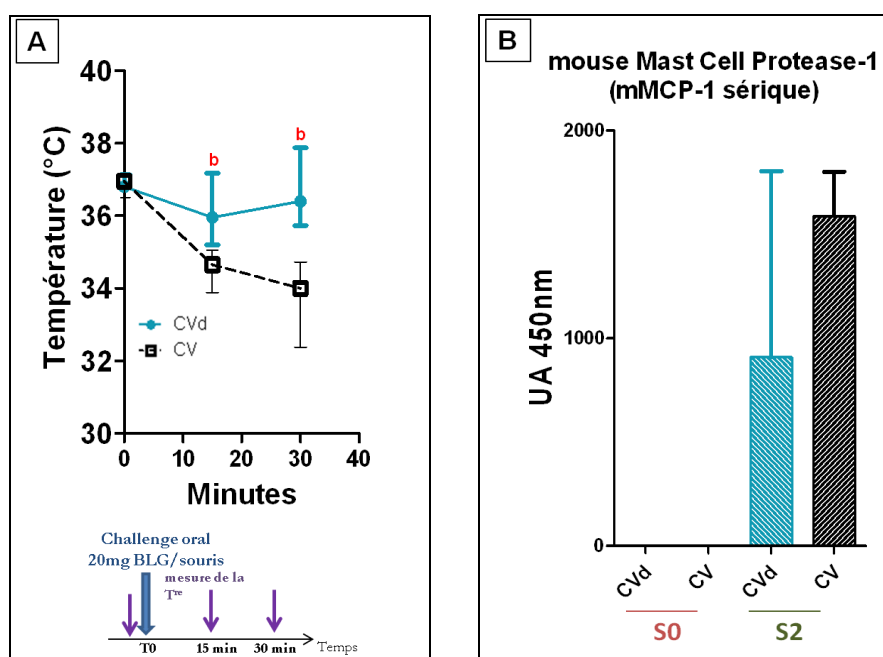
Concernant les anticorps mesurés dans les échantillons fécaux, nous n'avons pas détecté de production d'IgA sécrétoires spécifiques des protéines de lait chez les souris CVd et CV (résultats non montrés).

### **III.3.3. Réponses induites par le challenge oral**

Les souris ont reçu un challenge oral de BLG une semaine après la dernière administration de lait de vache afin de mettre en évidence ou non une réaction allergique suite à la sensibilisation expérimentale.

Les températures mesurées au niveau rectal avant le challenge oral sont similaires entre les souris CVd et CV. Cependant, 15 min après le challenge oral, la diminution de la température des souris CV est significativement plus importante que celle des souris CVd. Les mesures effectuées 30 min après le challenge oral, montrent que la température des souris CV a encore diminué tandis que celle des souris CVd commence à remonter (**Figure 30 (A)**).

La libération de mMCP-1 est induite lors de la dégranulation des mastocytes. La présence de mMCP-1 n'est détectée qu'après le challenge oral. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les souris CVd et CV (**Figure 30 (B)**).



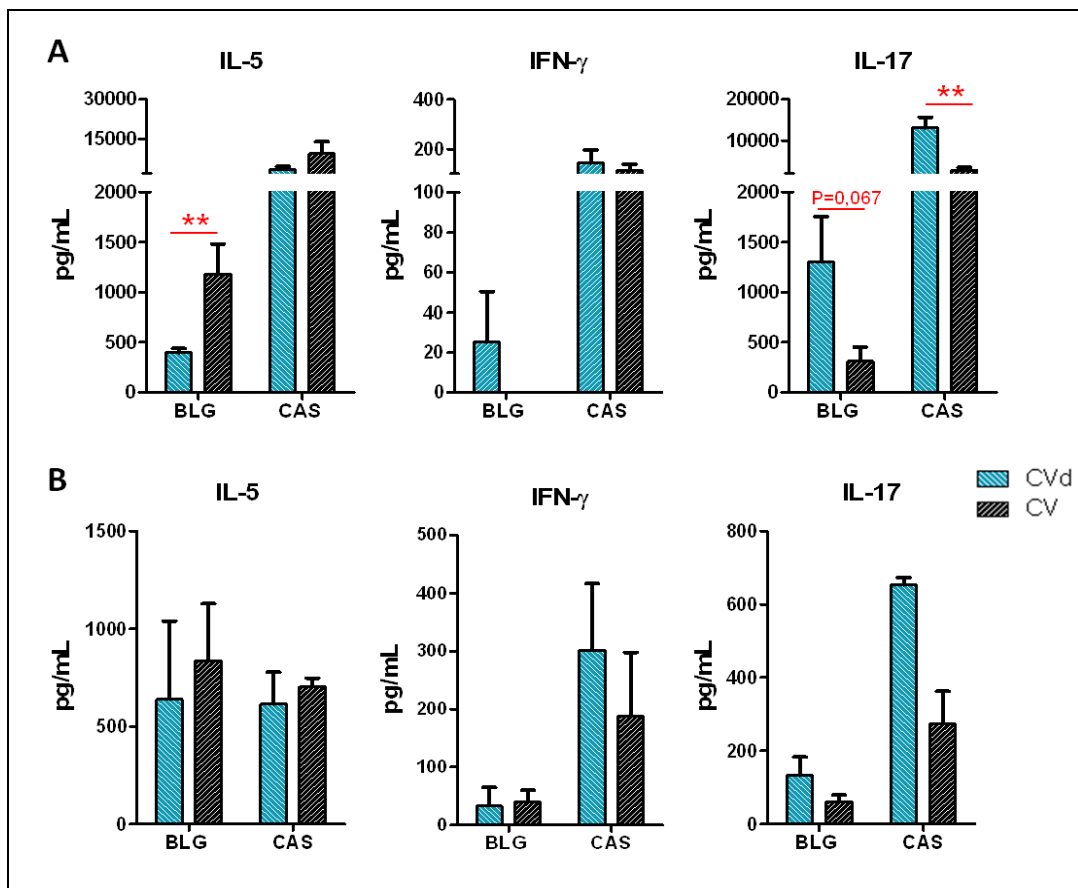
**Figure 30: Evolution de la température corporelle des souris CVd et CV (A) et induction de mMCP-1 (B) suite au challenge oral**

La température des souris a été mesurée au niveau rectal avant le challenge oral puis 15 et 30 min après. Les résultats sont exprimés en °C sous forme de médiane ; intervalle interquartile (A). Le dosage des mMCP-1 a été réalisé par méthode ELISA sur des échantillons sanguins prélevés avant la sensibilisation expérimentale (J-9, S0) et après le challenge oral (J42, S2) traités individuellement et dilués (1/100). Les résultats sont exprimés en unité d’Absorbance (UA) à 450 nm. Les données ont été analysées à l’aide du test statistique Mann Whitney. Les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (b= p<0,001). La médiane (intervalle interquartile) est indiquée.

### **III.3.4. Réponses cellulaires (sécrétion de cytokines après réactivation *in vitro*)**

Le niveau de sécrétion d’IL-5 est plus élevé pour les splénocytes provenant des souris CV réactivés par la BLG, par rapport à ceux des souris CVd. La sécrétion d’IL-17 par les splénocytes provenant des souris CVd réactivés par la CAS est significativement plus élevée par rapport à ceux des souris CV et la même tendance est observée pour les splénocytes réactivés par la BLG. Nous n’observons aucune différence significative pour la sécrétion d’IFN- $\gamma$  (Figure 31 (A)).

Le profil de sécrétion de cytokines par les cellules issues des ganglions mésentériques ne présentent pas de différence significative, mise à part pour la sécrétion d’IL-17 par les cellules réactivées par la CAS (Figure 31 (B)).



**Figure 31: Sécrétion de cytokines après réactivation des cellules issues des rates (A) et des MLN (B) par la BLG et la CAS**

Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les données ont été analysées à l'aide du test t de student. Les différences significatives sont indiquées entre les souris CVd et CV (\* $p < 0,05$ ).

### **III.4. DISCUSSION**

Les résultats de notre étude suggèrent que la colonisation du tractus digestif de souris axéniques âgées de 3 semaines par un microbiote conventionnel diminue leur susceptibilité à être sensibilisées aux protéines du lait de vache.

Nous avons en effet observé que les taux d'IgE et d'IgA sériques dirigées contre ces protéines sont significativement inférieurs chez les souris CVd comparés à ceux des souris CV. Les taux d'IgG1 spécifiques suivent la même tendance. Cependant les différences ne sont pas significatives peut-être à cause de la forte variabilité des réponses IgG1 mesurées chez ces souris. De plus, le challenge oral induit une chute de température plus importante chez les souris CV que chez les souris CVd ce qui illustre que le déclenchement de la réaction allergique est moindre chez les souris CVd même si nous n'observons pas de différence significative pour la libération de mMCP-1 dans le sérum.

Ces résultats diffèrent donc de l'étude précédente pour laquelle la conventionnalisation de souris axéniques à l'âge de 6 semaines n'avait pas permis de corriger le biais Th2 des réponses induites chez les souris Ax (S Morin et al. 2012). Ceci confirme bien que la période d'implantation du microbiote intestinal est un facteur critique pour l'induction d'une maturation correcte du système immunitaire, équivalente à celle observée chez les souris CV, qui n'est finalement pas obtenu en implantant le microbiote à 3 ou 6 semaines.

Dans cette dernière étude, nous avons mis en évidence des différences entre les souris CV et CVd au niveau de la composition du microbiote intestinal qui pourraient également expliquer la différence de réactivité entre les 2 lots de souris. En effet, l'analyse de la composition du microbiote fécal des souris par FISH révèle entre autres que les bactéries appartenant au genre *Clostridium leptum* et au groupe *Lactobacillus-Enterococcus* sont plus représentées dans le microbiote des souris CVd comparé à celui des souris CV. Nous n'avons pour l'instant aucune hypothèse permettant d'expliquer les différences de composition entre les souris CVd et CV pour ces groupes bactériens. Toutefois, le rôle potentiellement protecteur des genres *Clostridium Leptum* et *Lactobacillus* dans le développement de l'allergie alimentaire a déjà été suggéré. Atarashi *et al.* ont montré que le groupe *Clostridium leptum* pouvait affecter l'accumulation et l'activité des lymphocytes Treg au niveau intestinal. Ils rapportent en effet que la colonisation de souris BALB/c axéniques par 46 souches de

*Clostridium* appartenant au cluster IV et XIVa (aussi connu sous les noms respectifs de *Clostridium leptum* et groupe coccoides) induit le développement de Treg au niveau intestinal, plus particulièrement au niveau du colon (**Atarashi et al. 2011**). Par ailleurs, des souris CV inoculées oralement avec le mélange des 46 souches à l'âge de 2 semaines et sensibilisées ultérieurement à l'ovalbumine produisent également des quantités d'IgE spécifiques moins élevées que les souris CV contrôles. De même, les lactobacilles ont largement été décrits comme pouvant influencer les fonctions immunitaires *via* différents mécanismes immunologiques agissant sur les entérocytes, les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T, B et Treg (**del Giudice et al. 2010**).

Une autre différence importante entre les souris CV et CVd tient au mode de conventionnalisation lui-même. En effet, dans notre étude, les souris axéniques ont été inoculées avec un microbiote déjà complexe alors que normalement l'implantation du microbiote intestinal est séquentielle. Ces variations de processus de colonisation pourraient favoriser l'implantation de certaines souches. Gilliland et al., ont étudié la succession des communautés bactériennes durant la conventionnalisation de souris axéniques au niveau du jéjunum et du cæcum. Cette étude montre qu'au niveau du cæcum, une diversité similaire à celle des donneurs n'est atteinte qu'à partir du 7<sup>ème</sup> jour après la conventionnalisation, tandis que cette similarité n'est observable qu'à partir du 21<sup>ème</sup> jour au niveau du jéjunum (**Gilliland et al. 2012**). Dans notre étude, la pression exercée par l'inoculation de ce microbiote déjà complexe pourrait être à l'origine de la prévention du développement des réponses de type Th2 après la sensibilisation expérimentale. En effet, Hansen et al. ont montré que des souris Ax conventionnalisées à l'âge de 3 semaines présentaient un système immunitaire particulièrement biaisé vers un profil pro-inflammatoire en comparaison avec des souris Ax, CV ou conventionnalisées à 1 semaine (**Hansen et al. 2012**). Dans notre étude, bien que nous n'ayons pas observé de différence significative pour la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , la sécrétion d'IL-17 par les splénocytes réactivés en présence des protéines du lait de vache (BLG et CAS) est plus forte chez les souris CVd comparée aux souris CV. Cela illustre donc l'orientation des réponses immunes des souris CVd vers un profil pro-inflammatoire. Le développement de ces réponses pro-inflammatoires chez les souris CVd de notre étude pourrait inhiber le développement des réponses Th2 induites par la sensibilisation expérimentale ; ces réponses pro-inflammatoires expliqueraient ainsi la relative protection des souris CVd vis-à-vis du développement des réponses de type allergique. L'IL-17 (acteur majeur des réponses inflammatoires autoimmunes) peut en effet exercer un rétro-contrôle

négatif et potentiellement inhiber l'inflammation allergique de type Th2 (**Shah 2012, Bogiatzi et al. 2012**).

En contre-partie, le déséquilibre important vers les réponses Th17 observé chez les souris CVd pourrait être à l'origine d'effets délétères car les réponses Th17 sont associées au développement de maladies auto-immunes comme les maladies inflammatoires intestinales (**Alex et al. 2009**). Il serait ainsi intéressant de tester la susceptibilité des souris conventionnalisées à 3 semaines dans des modèles de colite ulcéreuse induite avec le Dextran Sodium Sulfate (DSS) ou le Trinitrobenzène Sulfonic acid (TNBS). Dans l'étude d'Atarashi *et al.*, les auteurs avaient utilisé le modèle utilisant le DSS pour démontrer les effets bénéfiques de l'administration des clostridiens appartenant au cluster IV et XIVa sur le développement de la colite induite au DSS (**Atarashi et al. 2011**). Dans notre cas, la réponse proinflammatoire induite par la conventionnalisation à 3 semaines chez les souris CVd pourrait être à l'origine du développement de colites plus sévères par rapport aux souris CV.



# IV. IMPACT DE LA COLONISATION NÉONATALE DU TRACTUS DIGESTIF PAR LA SOUCHE *LACTOBACILLUS CASEI* BL23 SUR LA SENSIBILISATION AU LAIT DE VACHE

---

## IV.1. INTRODUCTION

Les résultats de nos études précédentes montrent qu'un retard de la colonisation bactérienne du tractus-gastro-intestinal de souris axéniques (à l'âge de 3 ou de 6 semaines) induit des perturbations au niveau des réponses immunes induites après une sensibilisation expérimentale. Nos résultats montrent que les souris conventionnalisées à 3 semaines qui possèdent un microbiote plus riche en lactobacilles par rapport aux souris CV, développent des réponses de type allergique moins fortes que les souris CV ; ce qui confirme que les lactobacilles pourraient jouer un rôle dans la prévention de l'allergie alimentaire.

En effet, il a été rapporté que des enfants qui développent des allergies semblent être caractérisés par un microbiote intestinal comportant des proportions plus faibles en lactobacilles et bifidobactéries (Sjögren et al. 2009). Une autre étude a aussi observé que les enfants dont les parents sont allergiques sont moins fréquemment colonisés par des lactobacilles comparés à des enfants dont les parents ne sont pas allergiques. De plus, cette étude suggère que la colonisation par des lactobacilles (*L.casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) durant des périodes précoces du développement diminue le risque d'allergie à l'âge de 5 ans en dépit de l'hérédité allergique (Johansson et al. 2011). Enfin, certaines souches de lactobacilles apparaissent comme de bons candidats pour l'amélioration de manifestations allergiques telles que l'eczéma atopique (Isolauri et al. 2000, Borchers et al. 2009).

Dans ce cadre, un projet de recherche du laboratoire portant sur l'influence d'une souche de *Lactobacillus casei* sur la prévention d'une sensibilisation aux protéines de lait de vache est actuellement financé en partie par Syndifrais-CNIEL. La première étude de ce projet consiste à analyser les effets de la colonisation néonatale par la souche *Lactobacillus casei* BL23) sur la modulation de la réponse immunitaire dirigée contre les protéines du lait de vache suite à une sensibilisation orale expérimentale en présence de toxine cholérique.

La souche *L. casei* BL23 (*L. casei* ATCC 393 (pLZ15<sup>-</sup>)) (**Acedo-Félix and Pérez-Martínez 2003**) est une souche bien caractérisée. Cette souche est quasiment identique à la souche ATCC334, isolée à partir d'un fromage et ressemble également à d'autres souches probiotiques déjà utilisées industriellement (**Mazé et al. 2010**).

Ses propriétés immunomodulatrices des réponses Th2 ont déjà été étudiées au laboratoire dans un modèle de sensibilisation à la BLG (**Hazebrouck et al. 2006, Hazebrouck et al. 2007, Hazebrouck et al. 2009a**). Différents modèles expérimentaux d'inflammation intestinale ont également permis d'observer ses propriétés immunomodulatrices des réponses Th1 (**Rochat et al. 2007, Foligne et al. 2007**).

## **IV.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **IV.2.1. Milieux et réactifs**

Le lait de vache entier stérilisé UHT (GrandLait Candia, Paris, France) et la toxine cholérique (CT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) ont été utilisés pour la sensibilisation expérimentale par voie orale.

Les protéines du lait de vache (caséines,  $\alpha$ -lactalbumine et BLG) ont été isolées, purifiées et caractérisées dans les conditions préalablement décrites.

### **IV.2.2. Souris : origine et conditions d'élevage**

Les souris utilisées sont des femelles de souche BALB/cByJ. Les souris conventionnelles (CV) sont des souris SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free) provenant des laboratoires Charles River (CRL, l'Arbresle, France).

Les souris axéniques (Ax) proviennent de l'animalerie gnotoxénique Anaxem de l'Institut MICALIS (INRA, Jouy en Josas, France).

Les souris mono-associées à la souche *L.casei* BL23 (Mx) proviennent également de l'animalerie gnotoxénique Anaxem de l'Institut MICALIS (INRA, Jouy en Josas, France). Un élevage a été réalisé afin d'obtenir des souris colonisées dès la naissance par cette souche uniquement. Des couples reproducteurs de souris BALB/c Ax ont été inoculés par une préparation de bactéries (*L.casei* BL23 dans le milieu MRS (MRS Broth Lactobacilli) à l'âge adulte. Après la vérification de l'implantation de cette souche en monoxénie, nous avons utilisé les souriceaux femelles provenant des parents monoxéniques. Les souris Mx sont également hébergées en isolateur afin de maintenir la composition du microbiote intestinal. Nous avons effectué un dénombrement dans les échantillons fécaux provenant des souris Mx afin de contrôler le niveau d'implantation des bactéries qui était en moyenne de l'ordre de  $1,410^9$  CFU/g de fèces.

Les souris reçoivent à volonté de l'eau stérile autoclavée et de la nourriture dépourvue de protéines de lait de vache (R03, SAFE, Augy, France), stérilisée par irradiation (IBA Mediris, Fleurus, Belgique).

### **IV.2.3. Observation des caractéristiques physiologiques des souris Ax, Mx et CV**

#### **IV.2.3.1. Prélèvement d'organes**

Les organes d'intérêt (cæcums et intestins) ont été prélevés chez des souris axéniques, monoxéniques et conventionnelles naïves âgées d'environ 8 semaines. Les cæcums ont été photographiés et pesés.

#### **IV.2.3.2. Coupes histologiques d'intestin et marquages immunohistochimiques**

Les intestins ont été congelés dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Les organes ainsi congelés ont été conservés à -80°C. Des coupes de ces tissus (5µm) ont été réalisées au cryostat (Leica CM3050 S, Leica microsystems) et placées sur des lames superfrost plus (Thermoscientific) afin de réaliser des marquages immunohistochimiques. Après fixation des coupes par immersion dans de l'éthanol (95%, -20°C) pendant 5 minutes et séchage à l'air libre, le contour des coupes est délimité à l'aide d'un crayon marqueur à tracé hydrophobe (Dako Pen, Dako, Danemark) afin de limiter la consommation de réactifs.

De façon générale, un rinçage en tampon PBS-Tween (0,05%)-lait (1%) a été effectué après chaque application de réactifs.

Le blocage de l'activité des peroxydases endogènes a été réalisé par l'application d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) pendant 10 minutes sur chaque coupe, suivie d'une application d'avidine puis de biotine (Avidin/Biotin blocking kit, Invitrogen) pendant 15 minutes chacune.

Les marquages des cellules CD4<sup>+</sup> et des cellules CMH II<sup>+</sup> ont été effectués par l'application sur les coupes des anticorps biotinylés anti-CD4 (anti-mouse CD4 fonctionnal grade biotin, clone GK1.5, eBioscience) et anti-CMH-II (anti-CMH Class II [ER-TR3] (biotin), abcam), dilués dans du tampon PBS-BSA 1%, (respectivement 1/50 et 1/100) pendant 1h30 à température ambiante.

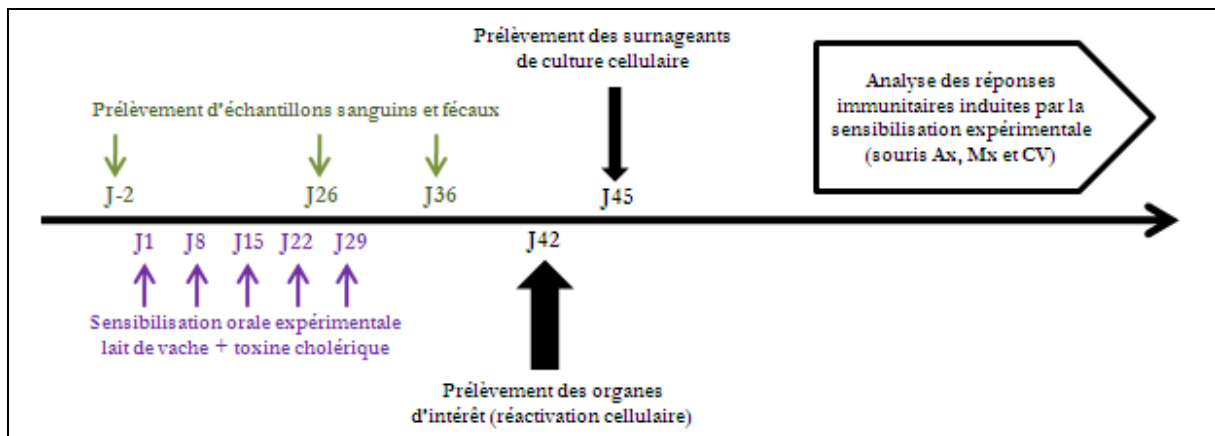
La révélation du marquage a été effectuée par l'application de streptavidine couplée à la horseradish peroxydase (HRP) (streptavidin-Horseradish Peroxydase pré-diluted, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, BD Biosciences) pendant 45 minutes minimum, selon les recommandations du fournisseur suivi de l'application du substrat de la HRP pendant 5 minutes (Novared<sup>TM</sup>, substrate kit (for peroxydase), Vector).

La contre-coloration a été réalisée par l'application rapide d'hématoxyline (environ 10 secondes) (Mayer haemalum, RAL diagnostics, France) suivie de l'application (2 fois 15 secondes) d'une solution de bicarbonate de sodium (0,1%) utilisée en tant qu'agent de bleuissement. Le montage des lamelles sur les coupes a été effectué à l'aide de liquide de montage (Eukitt, CML, France) après un passage dans 4 bains d'éthanol successifs (85%, 90%, 95% et 100%) suivis de 3 bains successifs dans du toluène (Sigma Aldrich). Des coupes contrôles ont été réalisées dans les mêmes conditions mais en absence d'anticorps.

Les lames comportant les coupes sont conservées à température ambiante. L'observation des tissus ainsi préparés a été réalisée à l'aide d'un scanner de lames colorées, à haute résolution (NanoZoomer, Hamamatsu Technology) et les images ont été traitées à l'aide du logiciel NanoZoomer Digital Pathology virtual viewer (NDP.view).

#### **IV.2.4. Protocole expérimental de sensibilisation**

Des souris Ax (n=10), Mx (n=10) et CV (n=10) âgées d'environ 9 semaines à J0 ont été sensibilisées expérimentalement par l'administration de lait de vache en présence de toxine cholérique (200µl par voie orale en présence de toxine cholérique (10µg/souris)) à J1, 8, 15, 22 et 29 (**Figure 32**).



**Figure 32: Protocole expérimental**

Afin d'analyser la réponse immunitaire provoquée par la sensibilisation expérimentale, des prélèvements d'échantillons sanguins et fécaux ont été effectués, comme précédemment décrit (**Morin et al. 2011 et 2012**) chez toutes les souris, avant, pendant et après la sensibilisation (J-2, J26 et J36).

Les organes d'intérêt (rate et ganglions mésentériques) ont été prélevés le jour du sacrifice des souris (J42) afin remettre en culture les cellules issues de ces organes en présence d'activateur (réactivation *in vitro*). Les différentes manipulations sur les souris ont été effectuées selon la réglementation en vigueur suivant les recommandations européennes (Council directives on the protection of animals for experimental and other scientific purposes. J. Off. Communautés Européennes, 86/609/EEC), à l'aide d'un chercheur habilité (Stéphane Hazebrouck, autorisation à expérimenter n° 91-243).

#### **IV.2.5. Dosage des anticorps spécifiques dans les échantillons sanguins et fécaux**

Des protéines purifiées du lait de vache (BLG,  $\alpha$ -lactalbumine, CAS, caséine- $\alpha$ S1, - $\alpha$ S2, - $\beta$ , et-  $\kappa$ ) sont directement immobilisées de façon individuelle sur des plaques de microtitration (Nunc Immunoplate Maxisorp). La détection des anticorps spécifiques de l'allergène (IgG1, IgG2a, IgA et IgE) est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les réponses IgA spécifiques de l'allergène sont également mesurées dans les échantillons fécaux. Les résultats sont exprimés en unité d'absorbance (UA) à 414nm.

#### **IV.2.6. Dosage des cytokines**

Le dosage des cytokines est réalisé à partir des surnageants de culture cellulaire prélevés après la réactivation *in vitro* des cellules issues des rates et des ganglions mésentériques par la BLG et la CAS. Les cytokines dosées sont l'IL-4, l'IL-10, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17. Les résultats sont exprimés en pg/mL après soustraction des niveaux de base déterminés dans les surnageants de cultures cellulaires non stimulées. Le profil de sécrétion de cytokines par les cellules issues des ganglions mésentériques n'a pas fait l'objet d'analyse statistique car les cultures cellulaires ont été réalisées à partir de pools de cellules provenant des 10 souris du même lot. Ces dosages utilisent des kits (Milliplex map kit, Millipore, Billerica, USA) selon les recommandations fournies. L'acquisition et l'analyse des résultats se font au Bio-Plex (Bio-Plex 100, Bio-Rad).

#### **IV.2.7. Analyse des populations lymphocytaires par cytométrie en flux**

Les cellules provenant des rates prélevées chez les souris en fin de protocole (J) sont distribuées sur plaque 96 puits ( $8.10^4$  cellules/puits). La première étape consiste à bloquer les sites de fixation non spécifique par ajout de Fc block (Mouse BD Fc Block™, clone 2.4G2, BD Pharmingen) pendant 5 minutes à température ambiante. Les marquages membranaires sont ensuite effectués. Les cellules CD4<sup>+</sup> sont identifiées à l'aide d'un anticorps anti-CD4 (1µg pour  $10^6$  cellules, FITC Rat anti-Mouse CD4, clone GK1.5, BD Pharmingen). Après une incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et une étape de lavage en tamponn PBS, les cellules sont fixées et les membranes sont perméabilisées à l'aide des tampons disponibles dans les kits associés aux marquages intracellulaires. Les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg sont ensuite identifiées grâce aux marquages intracellulaires réalisés par l'ajout des anticorps anti-T-bet (anti-T-bet-Per-CP, clone 4B10, kit Santa Cruz biotechnology, USA), anti-GATA-3 (anti-human/mouse GATA-3-PE, clone TWAJ, kit eBioscience), anti-ROR-γt (anti-ROR-γt-FITC, clone 4G419, kit IMGENEX) et anti-Fox P3 (anti-Fox P3, clone 3G3, kit MACS Miltenyi Biotec, Allemagne), selon les recommandations du fabricant. Après une incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et un lavage en tampon PBS, les cellules sont remises en suspension dans du tampon PBS.

L'acquisition des résultats est effectuée grâce au système de cytométrie en flux Guava EasyCyte Plus (Millipore) à l'aide du logiciel Guava cytosoft™ (Data Acquisition and Analysis software version 5.3) qui permet également d'analyser les résultats.

#### **IV.2.8. Analyses statistiques**

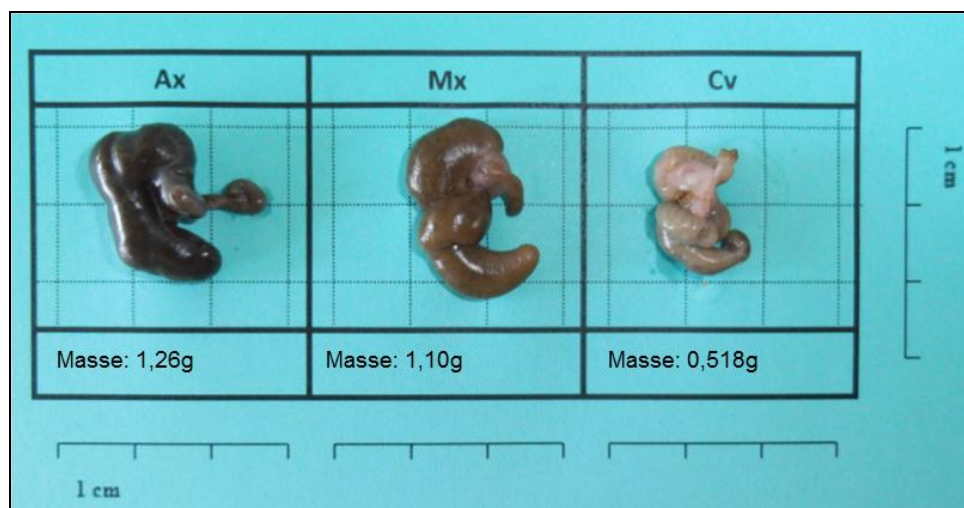
Les données sont analysées à l'aide du test statistique de Mann-Whitney ou du test t de Student. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.01. La différence est significative pour une valeur de  $p < 0,05$ , (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,0001$ ).

## IV.3. RÉSULTATS

### IV.3.1. Caractéristiques physiologiques des souris Ax, Mx et CV

Afin d'évaluer l'impact de la colonisation du tractus gastro-intestinal des souris Ax par la souche *L. casei* (BL23), nous avons analysé différents paramètres (taille des cæcums et identification des cellules  $CD4^+$  et  $CMH II^+$  au niveau intestinal par marquage immunohistochimique) chez des souris Ax, Mx et CV naïves âgées de 7 semaines environ.

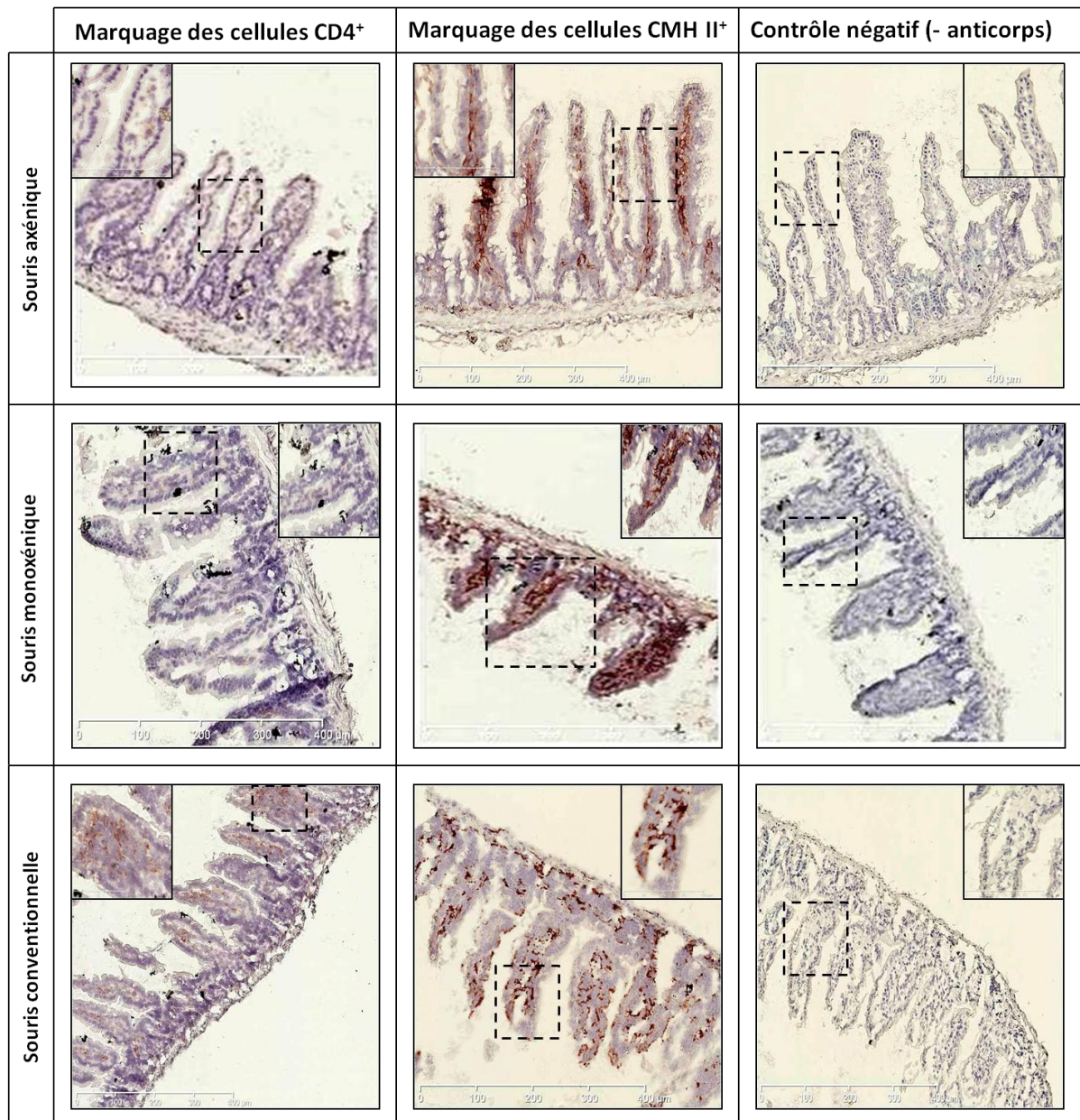
Les cæcums présentent des différences de taille, de masse et de couleur. Les cæcums des souris Ax et Mx sont de taille et de masse similaire. De plus, ils sont plus grands que celui des souris CV dont la masse représente environ la moitié de celles mesurées pour les souris Ax et Mx. Le contenu cæcal est donc moins important chez les souris CV et la couleur de celui des souris Ax (noir) est plus foncée que celui des souris Mx (marron) (**Figure 33**).



**Figure 33: Exemple de caecums prélevés chez des souris Ax, Mx et CV**

Les marquages immunohistochimiques effectués sur des coupes d'intestins congelés provenant de souris Ax, Mx et CV révèlent une proportion moindre de cellules  $CD4^+$  dans les intestins des souris Ax et Mx comparés aux souris CV. Les cellules  $CMH II^+$  (contrôle positif) sont présentes chez les différents lots de souris (**Figure 34**).





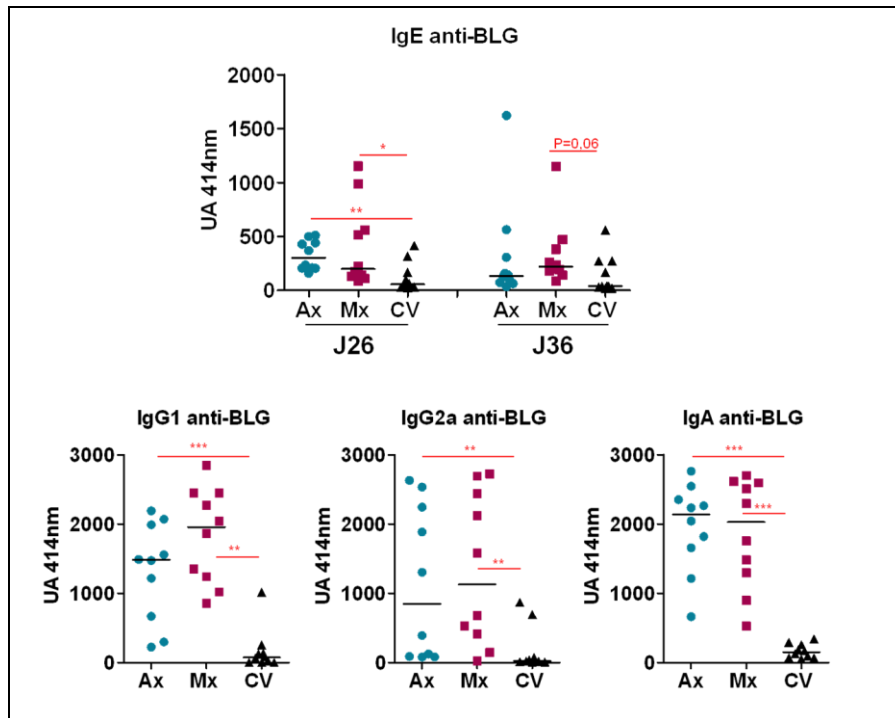
**Figure 34: Marquage immunohistochimique sur des coupes congelées d'intestin**

Le marquage des cellules CD4<sup>+</sup> et CMH II<sup>+</sup> (en rouge) a été réalisé sur des coupes (5μm) d'intestin de souris congelé. Les résultats présentent les photos obtenues à l'aide du nanozoomer (grossissement X10). La photo présentée en coin est un grossissement (X40) de la zone délimitée par les pointillés.

#### **IV.3.2. Réponses anticorps induites par la sensibilisation expérimentale**

La **Figure 35** présente les réponses IgE anti-BLG mesurées à J26 et J36 ainsi que les réponses IgG1, IgG2a et IgA anti-BLG mesurées à J36. Nous n'observons pas de différence significative entre les souris Ax et Mx pour les réponses anticorps anti-BLG. Chez les souris

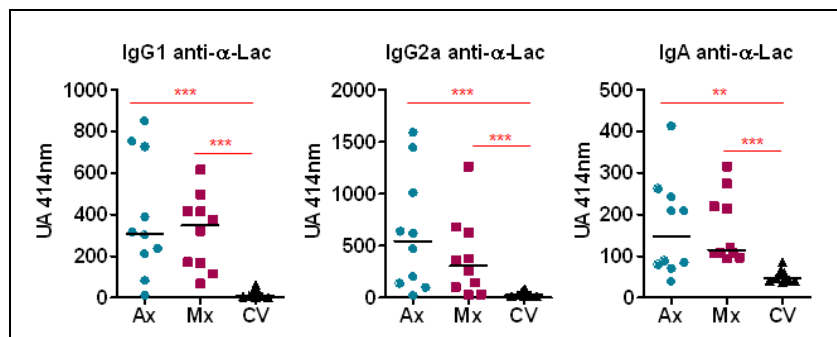
CV, le niveau de production d'anticorps anti-BLG est significativement moins élevé par rapport aux souris Ax et Mx.



**Figure 35: Réponses anticorps spécifiques de la BLG (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/200 pour les IgG2a et les IgA et 1/20000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés sous forme d'unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  et \*\*\* $p < 0,0001$ ). La médiane est indiquée.

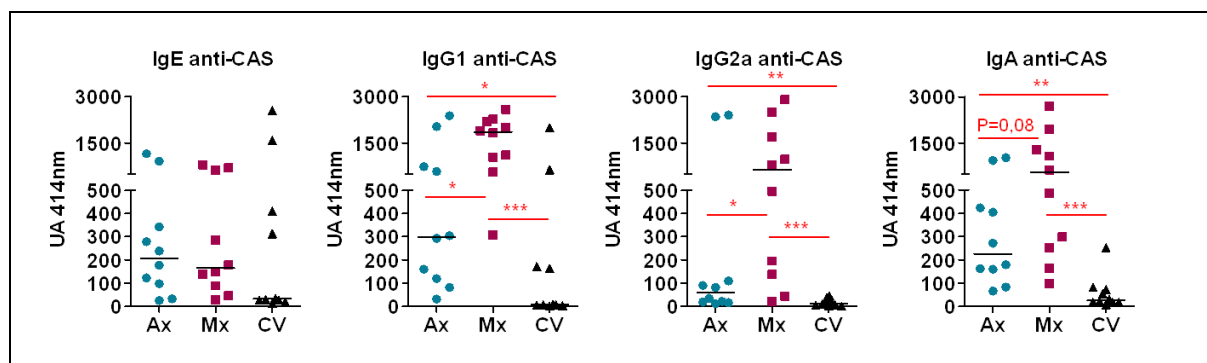
La **Figure 36** présente les réponses anticorps anti- $\alpha$ -Lac mesurées à J36. Aucune réponse IgE anti- $\alpha$ -Lac significative n'est observée chez les souris Ax, Mx et CV (résultats non montrés). Le niveau de production des IgG1, IgG2a et des IgA dirigées contre l' $\alpha$ -Lac est supérieur chez les souris Ax et Mx comparées aux souris CV.



**Figure 36: Réponses anticorps spécifiques de l' $\alpha$ -lactalbumine (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/200 pour les IgG2a et les IgA et 1/20000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés sous forme d'unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  et \*\*\* $p < 0,0001$ ). La médiane est indiquée.

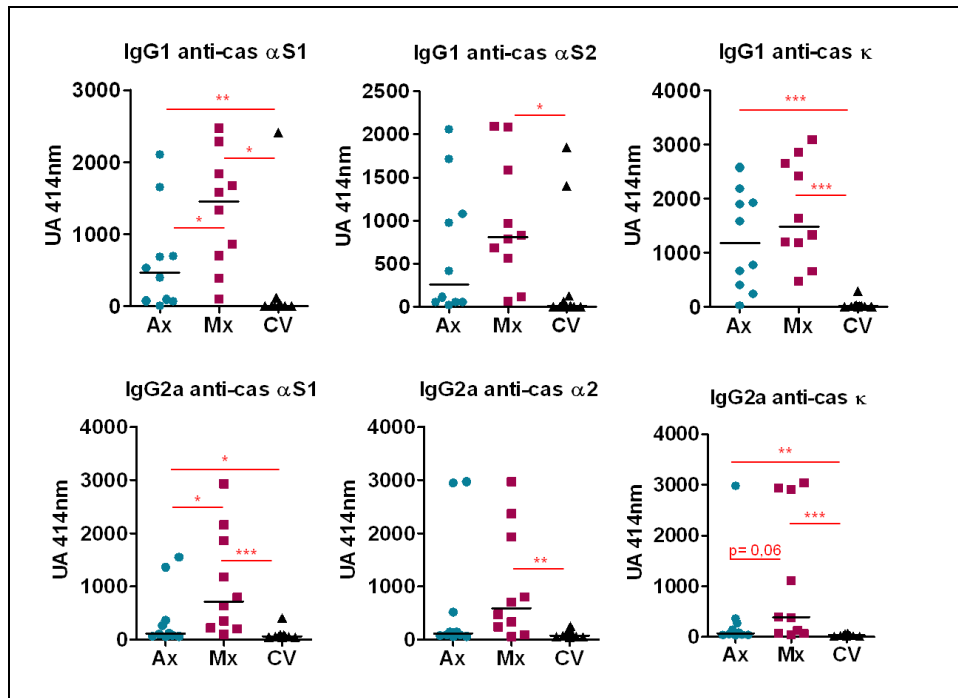
La **Figure 37** présente les réponses anticorps dirigées contre la caséine entière (CAS) mesurées à J36. Aucune différence significative n'est observée pour la réponse IgE. Cependant, les réponses IgG1 et IgG2a sont plus fortes chez les souris Mx comparées aux souris Ax et CV. La réponse IgA est supérieure chez les souris Ax et Mx comparées aux souris CV. Elle tend aussi à être plus forte chez les souris Mx comparées aux souris Ax.



**Figure 37: Réponses anticorps spécifiques de la CAS (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/50 pour les IgE, 1/200 pour les IgG2a et les IgA et 1/10000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés sous forme d'unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\* p<0,05; \*\*p<0,001 et \*\*\*p<0,0001). La médiane est indiquée.

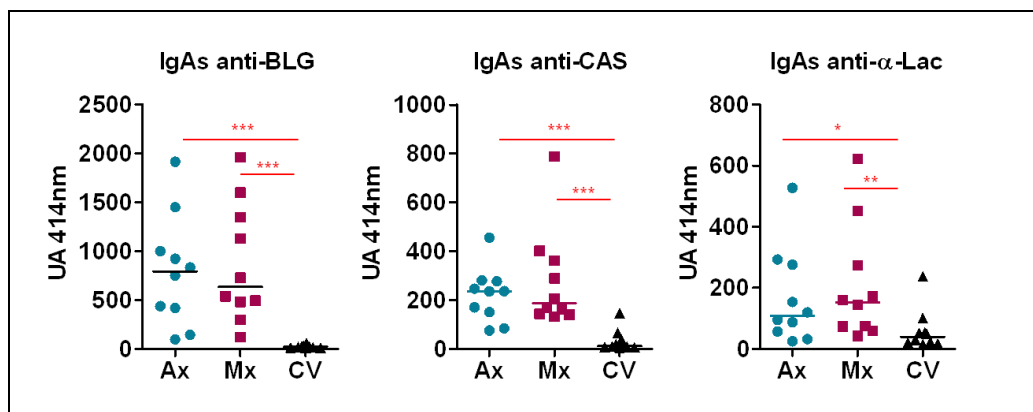
La **Figure 38** présente les réponses IgG1 et IgG2a dirigées contre les fractions de la CAS mesurées à J36. La réponse IgG1 anti-cas  $\alpha$ S1 est plus forte chez les souris Mx comparées aux souris Ax et CV. Les réponses IgG2a dirigées contre les caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2 et  $\kappa$  tendent à être plus fortes chez les souris Mx comparées aux souris Ax. Aucune réponse spécifique de la caséine  $\beta$  n'a été détectée (non montré).



**Figure 38: Réponses anticorps spécifiques des caséines (sérum)**

Les dilutions utilisées pour ces dosages diffèrent en fonction de l'anticorps (1/200 pour les IgG2a et 1/10000 pour les IgG1). Les résultats sont exprimés sous forme d'unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001 et \*\*\* p < 0,0001). La médiane est indiquée.

La **Figure 39** présente les réponses IgA sécrétoires spécifiques de la BLG et de la CAS mesurées dans les échantillons fécaux prélevés à J36. Ces réponses sont plus fortes chez les souris Ax et Mx comparées aux souris CV.



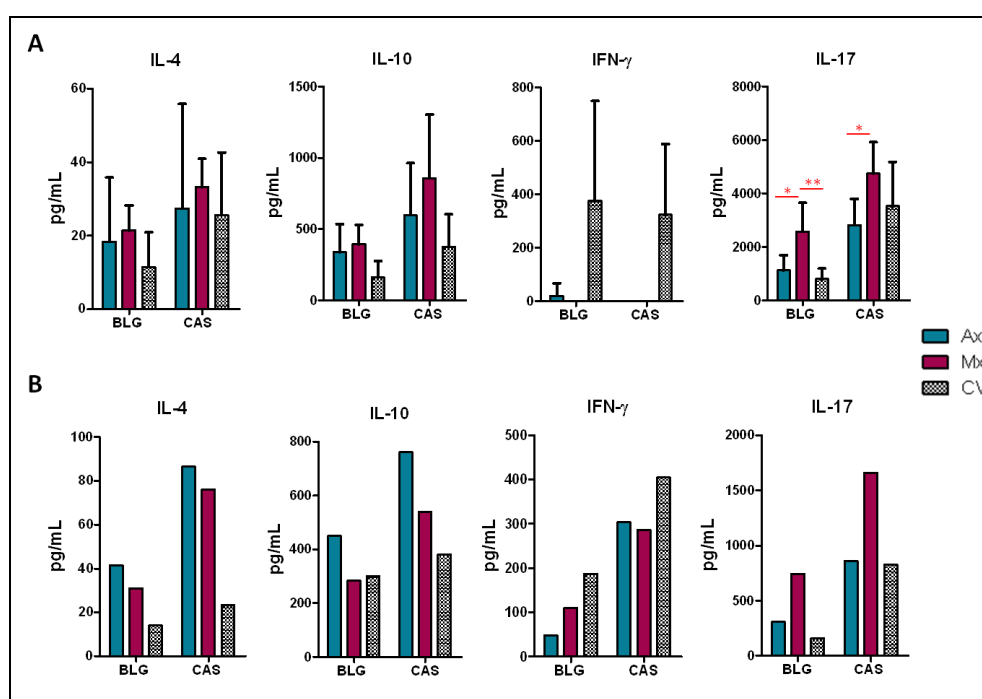
**Figure 39: IgA sécrétoires spécifiques mesurées dans les échantillons fécaux**

Le dosage des IgA sécrétoires a été réalisé à partir d'échantillons fécaux dilués à 0,1mg de protéines totales/mL. Les résultats sont exprimés sous forme d'unité d'Absorbance (UA) à 414 nm. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001 et \*\*\* p < 0,0001). La médiane est indiquée.

### IV.3.3. Réponses cellulaires (sécrétion de cytokines après réactivation *in vitro*)

Aucune différence significative n'est observée pour la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 après réactivation des splénocytes par la BLG ou la CAS. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  n'est détectée que pour les splénocytes des souris CV. Par contre, on observe une différence significative entre les souris Ax et Mx au niveau de la sécrétion d'IL-17 par les splénocytes réactivés par la BLG et la CAS (**Figure 40 (A)**).

Au niveau des ganglions méésentériques, on remarque que la production de cytokines de type Th2 (IL-4) est plus élevée chez les souris Ax et Mx comparées aux souris CV et que la production d'IL-17 est plus forte chez les souris Mx comparées aux souris Ax et CV (**Figure 40 (B)**).

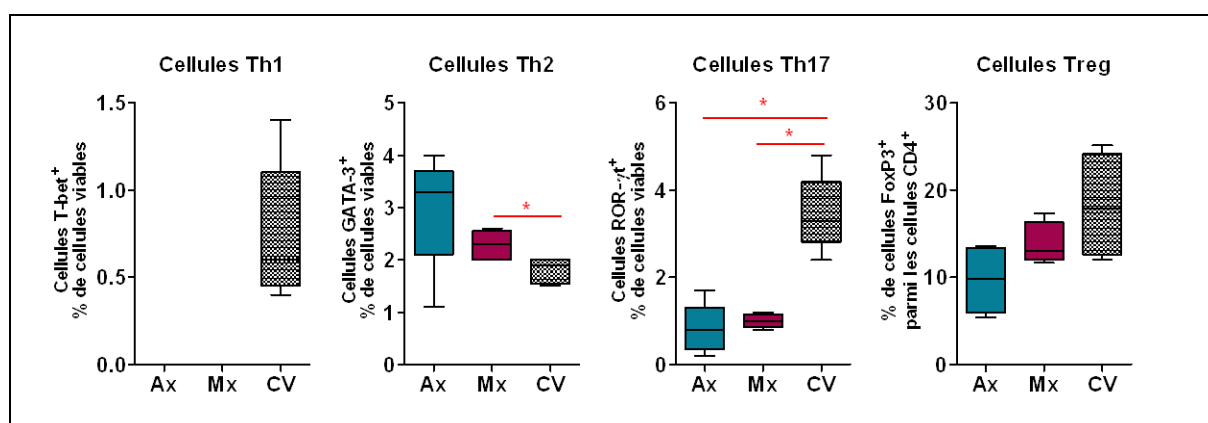


**Figure 40: Sécrétion de cytokines après réactivation des cellules issues des rates (A) et des MLN (B) par la BLG et la CAS**

Les résultats sont exprimés en pg/mL sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les données ont été analysées à l'aide du test t de student. Les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,005$ ).

#### IV.3.4. Analyse des populations lymphocytaires chez les souris sensibilisées

Les cellules Th1 n'ont été détectées que chez les souris CV. Le pourcentage de cellules Th2 est supérieur chez les souris Mx comparées aux souris CV. On observe la même tendance entre les souris Ax et CV mais la différence n'est pas significative. Le pourcentage de cellules Th17 est plus important chez les souris CV comparées aux souris Ax et Mx. Nous n'observons pas de différence significative concernant le pourcentage de cellule Treg (**Figure 41**).



**Figure 41: Pourcentage de cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17)**

Les résultats montrent le pourcentage de cellules T effectrices (Th1, Th2 et Th17) déterminé par l'analyse par cytométrie en flux parmi les cellules issues des rates prélevées à la fin du protocole expérimental. Les données ont été analysées à l'aide du test statistique Mann Whitney. Les différences significatives sont indiquées entre les souris Ax, Mx et CV (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  et \*\*\* $p < 0,0001$ ). La médiane (intervalle interquartile) est indiquée.

#### **IV.4. DISCUSSION**

Notre étude montre que malgré la présence en monoxénie de la souche *Lactobacillus casei* BL23, les souris Mx présentent des caractéristiques très proches de celles observées chez les souris Ax.

Par exemple les tailles des cæcums des souris Mx et Ax sont similaires et restent beaucoup plus grandes que celles du cæcum des souris CV. Cette différence est due à la présence d'une quantité plus importante de liquide dans le contenu caecal, car cet organe situé entre l'intestin grêle et le gros intestin est impliqué dans les processus d'absorption des fluides. L'importante rétention d'eau observée au niveau du cæcum des animaux axéniques est expliquée en partie par la diminution de la concentration en anions dans le contenu caecal (**Asano 1969, Wostmann 1981**). Dans notre étude, nous observons cependant une différence de couleur au niveau du contenu caecal chez les souris Mx et Ax. Chez la souris, cet organe permet la fermentation microbienne des aliments ingérés (**Burns et al. 2004**). Il contient en effet des bactéries spécifiques qui peuvent transformer certains aliments en nutriments absorbables. La différence de couleur du contenu caecal observée entre les souris Ax et Mx s'explique sans doute par la dégradation ou la digestion de certains composés par la souche BL23.

D'autre part, les marquages immunohistochimiques sur les coupes histologiques d'intestin révèlent également un déficit de cellules CD4<sup>+</sup> chez les souris Ax et Mx par rapport aux souris CV. Enfin, le profil des différentes populations cellulaires (Th1, Th2, Th17 et Treg) observées dans les rates après la sensibilisation des souris est comparable entre les souris Mx et Ax.

Toutefois, les réponses immunes spécifiques induites par la sensibilisation expérimentale révèlent des différences entre les souris Mx et Ax, en particulier au niveau des réponses dirigées contre la caséine. En effet, alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les souris Ax et Mx pour les réponses dirigées contre les protéines du lactosérum (BLG et  $\alpha$ -lactalbumine), la réponse IgG1 spécifique de la caséine  $\alpha$ S1 est significativement plus élevée chez les souris Mx par rapport aux souris Ax. Les différences sont encore plus marquées au niveau de la réponse IgG2a car celle-ci concerne toutes les fractions de la caséine entière, à l'exception de la caséine  $\beta$ . De même, la production d'IgA sériques anti-CAS tend à être plus forte chez les souris Mx que chez les souris Ax.

La modulation du développement des réponses anticorps spécifiques des caséines mais pas des protéines du lactosérum, peut être due à la capacité du *L. casei* à dégrader les caséines. En effet, les bactéries lactiques comme les *L. casei* sont capables de dégrader les caséines grâce à la production d'enzymes (protéinases et peptidases) spécifiques pour chaque fraction de la caséine (**Hegazi 1987, Pürschel and Pollack 1972**). Cette dégradation pourrait être à l'origine de la libération de composés immunogéniques responsables de l'augmentation des réponses immunes anti-CAS observées chez les souris Mx. Dans l'étude précédente sur l'impact d'une conventionnalisation à 6 semaines, nous avons suggéré que le niveau de sensibilisation des souris Ax contre les caséines pouvait être limité à cause de la nature insoluble des caséines et donc de leur incapacité à être transcytosées par les entérocytes. Cependant, chez les souris Mx, la dégradation des caséines par le *L. casei* pourrait conduire à la production de peptides solubles, capables d'être transcytosés et donc potentiellement de favoriser le développement d'une réponse immunogénique contre les caséines.

La modulation des réponses immunes induites par la sensibilisation expérimentale peut également être due aux propriétés immunomodulatrices de la souche BL23. La réactivation *in vitro* des splénocytes ou des cellules de MLN par la BLG ou la CAS a ainsi permis de mettre en évidence une plus forte production d'IL-17 chez les souris Mx par rapport aux souris Ax. Il apparaît donc qu'au niveau des réponses spécifiques des protéines de lait, la présence de la BL23 puisse déclencher l'induction d'une réponse Th17 alors que nous n'avons pas vu d'effet notable de la monocolonisation sur la répartition des différentes sous-populations cellulaires dans les rates de souris sensibilisées.

Lors d'une étude précédente, des administrations orales répétées d'un mélange de BL23 et de BLG à des souris CV avait permis d'inhiber le développement d'une réponse IgE lors de la sensibilisation expérimentale contre la BLG (**Hazebrouck et al. 2009a**). Dans ces conditions, la réactivation par la BLG des splénocytes des souris pré-traitées avec la BL23 et la BLG s'était également caractérisée par une très forte production d'IL-17 et à un niveau moindre, d'IFN- $\gamma$ . Il apparaît donc que dans ces conditions, l'effet principal de la BL23 n'est sans doute pas d'induire des réponses immuno-suppressives (en favorisant l'activation de cellules Treg) mais plutôt d'induire une réponse pro-inflammatoire.

Dans notre étude, l'absence d'influence de la souche BL23 pour la prévention des réponses IgE indique que l'implantation de la BL23 ne peut pas contre-balancer la déviation Th2 du système immunitaire des souris Ax.



Cependant, comme Languedries *et al.* l'ont très bien exprimé, c'est sans doute la pression bactérienne intense et diversifiée au sens large, exercée sur les muqueuses en bas âge, qui serait la clé de l'homéostasie ultérieure plutôt que la sélection de bactéries réputées moins agressives (**Langhendries et al. 2010**). Il serait donc sans doute intéressant d'étudier l'impact d'une présence précoce de la BL23 dans le tractus digestif des souris suivie d'une conventionnalisation (en imposant une période de monoxénie limitée dans le temps) afin d'induire une meilleure maturation du système immunitaire par rapport à celle induite par la seule présence du lactobacille.

# CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

---

L'objectif de mes travaux de thèse était d'évaluer le rôle du microbiote intestinal sur la susceptibilité de l'hôte à développer des réponses de type allergique à l'aide d'un modèle de souris BALB/c gnotoxéniques.

Une étude précédant mon arrivée avait déjà montré que le modèle des souris BALB/c gnotoxéniques était pertinent. Elle avait en effet mis en évidence le développement de réponses IgE plus élevées chez les souris Ax comparées aux souris CV après une sensibilisation intrapéritonéale en présence d'adjuvant.

Les premiers travaux effectués durant ma thèse ont montré que l'injection intrapéritonéale de BLG chez les souris Ax ne nécessitait pas d'adjuvant pour induire la production d'IgE spécifiques et que l'absence de microbiote intestinal permet donc de révéler les propriétés sensibilisantes intrinsèques de la BLG. Toutefois, l'administration de caséine dans les mêmes conditions n'a pas conduit à l'induction d'une réponse IgE spécifique. Ce protocole d'injection sans adjuvant était donc inadéquat pour l'évaluation des propriétés allergéniques intrinsèques de la caséine et donc des aliments en général. Ces résultats suggéraient également que pour étudier les phénomènes de sensibilisation aux protéines de lait de vache, il était sans doute plus intéressant d'opter pour une sensibilisation orale avec du lait afin de pouvoir évaluer les réponses induites par les différents allergènes du lait tout en respectant la matrice alimentaire et une voie de sensibilisation physiologique.

L'utilisation de ce protocole de sensibilisation par voie orale a ainsi confirmé que le niveau de sensibilisation des souris Ax est plus élevé que celui des souris CV, en particulier pour la BLG. De plus, la réponse IgE dirigée contre la BLG est induite de façon plus précoce par rapport à celle contre la caséine.

L'application de ce protocole de sensibilisation à des souris Ax conventionnalisées à différentes périodes du développement nous a ensuite permis de mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, que la fenêtre d'implantation du microbiote intestinal influence de manière déterminante la susceptibilité de l'hôte à développer une sensibilisation.

En effet, la conventionnalisation réalisée trois semaines après le sevrage ne permet pas de retrouver les effets « protecteurs » d'un microbiote intestinal normalement acquis à la naissance. A l'inverse, la conventionnalisation au moment du sevrage diminue la susceptibilité des souris à développer les réponses caractéristiques de la sensibilisation et de la réaction allergique. Cette protection contre le développement de réponses de type Th2 est certainement due à la réponse pro-inflammatoire du système immunitaire induite lors de la conventionnalisation. Elle se fait peut-être au prix d'une sensibilité accrue à des pathologies mettant en jeu le développement de réponses de type Th1 et Th17. Il serait donc sûrement très intéressant de tester l'influence d'une implantation tardive du microbiote intestinal dans un modèle de colite expérimentale afin de mesurer l'impact d'un retard de colonisation bactérienne sur le développement des maladies inflammatoires intestinales.

Mes travaux ont donc mis en évidence l'importance de la fenêtre temporelle d'implantation du microbiote intestinal qui correspond à la fenêtre d'opportunité permettant l'action de l'environnement sur l'organisme. Au début de ma thèse, les données de la littérature indiquaient qu'une conventionnalisation même tardive était capable d'induire une maturation correcte du système immunitaire intestinal (par exemple, pour le développement du GALT (MLN, PP, LP...)) et permettait de retrouver les caractéristiques d'un animal conventionnel. Cependant, particulièrement depuis cette année, de plus en plus d'études confirment que la colonisation tardive du tractus digestif des souris Ax induit des modifications persistantes à long terme au niveau du système immunitaire et de sa réactivité à différents stimuli. Certaines différences, au niveau du transcriptome, ont même été rapportées entre des souris CV et des souris nées de souris Ax mais conventionnalisées dès la naissance, suggérant ainsi que dès la vie utérine, le microbiote de la mère pourrait jouer un rôle important pour le développement du fœtus (**Yamamoto et al. 2012**).

Ces différentes données confirment l'intérêt des modèles de souris gnotoxéniques qui permettent d'évaluer l'importance du microbiote intestinal sur le développement du système immunitaire de l'hôte et sur sa réactivité. Elles révèlent cependant également leur faiblesse puisque toute période sans microbiote (ou avec un microbiote réduit) peut induire chez l'hôte des effets à long terme, qui ne pourront pas être corrigés par l'implantation d'un microbiote plus ou moins complexe.

Dans ce cadre, il serait sans doute nécessaire de confirmer les résultats obtenus sur souris gnotoxéniques à l'aide d'autres modèles expérimentaux sur des souris conventionnelles, soit en utilisant des nouveau-nés, soit des animaux transgéniques ou tout autre stratégie permettant de s'affranchir des effets induits par les périodes d'axénie (utilisation d'antibiotiques par exemple).

La caractérisation des modifications épigénétiques induites par la composition du microbiote intestinal devrait également être incluse dans les prochaines expériences afin de caractériser les effets du microbiote intestinal sur le système immunitaire durant les périodes précoces du développement. L'étude de ces modifications stables et transmissibles pourrait peut-être permettre de mieux comprendre la variabilité interindividuelle observée durant les expériences.

L'impact de la colonisation néonatale des souris Ax par la souche *Lactobacillus casei* BL23 semble assez limité même si des effets significatifs ont été observés au niveau des réponses anticorps spécifiques des caséines. La présence d'une diversité réduite d'antigènes bactériens est sans doute insuffisante pour stimuler la maturation du système immunitaire.

Dans ce cadre, nous envisageons de limiter la période de monoxénie aux premières semaines de vie des souris puis de les conventionnaliser afin d'assurer un certain niveau de maturation du système immunitaire. Nous pourrions ainsi évaluer si la présence précoce du *L. casei* dans le tractus digestif induit des effets bénéfiques sur le développement d'une sensibilisation au lait de vache.

D'autres souches bactériennes, avec des propriétés immuno-régulatrices différentes, pourraient également être testées. Notre étude sur la conventionnalisation des souris à 3 semaines suggèrent un rôle potentiellement protecteur des bactéries *Clostridium leptum*. Nous pourrions ainsi évaluer les effets de souches bactériennes appartenant au genre *Clostridium leptum* comme *Faecalis praustnizii* du fait de l'implication de ces souches dans des effets bénéfiques déjà décrits pour l'hôte. Ces souches pourraient être testées en les implantant au moment du sevrage afin de voir si elles sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire du système immunitaire et si elle affecte de manière significative le développement d'une sensibilisation de type allergique.

Les études impliquant une implantation durant la période néonatale pourraient être ensuite réalisées avec des souches bien caractérisées car la mise en place d'un élevage de souris monoxéniques dès la naissance nécessite d'importants moyens.

Enfin, mes travaux de thèse visaient essentiellement à étudier les aspects immuno-analytiques de la sensibilisation allergique expérimentale.

J'ai aussi pu aborder certains aspects cellulaires, notamment la caractérisation par cytométrie en flux des différentes populations lymphocytaires au niveau intestinal et systémique. J'ai également mis en place les techniques d'immunohistochimie qui n'étaient pas encore utilisées au laboratoire. L'étude des mécanismes cellulaires mis en jeu lors du développement d'une sensibilisation vont faire maintenant l'objet d'études plus ciblées au laboratoire.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abreu, M. T., M. Fukata & M. Arditi (2005) TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*, 174, 4453-60.
- Acedo-Félix, E. & G. Pérez-Martínez (2003) Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 67-75.
- Adel-Patient, K., S. Ah-Leung, H. Bernard, C. Durieux-Alexandrenne, C. Créminon & J. M. Wal (2007) 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. *Int Arch Allergy Immunol*, 143, 10-20.
- Adel-Patient, K., S. Ah-Leung, C. Creminon, S. Nouaille, J. M. Chatel, P. Langella & J. M. Wal (2005a) Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy*, 35, 539-46.
- Adel-Patient, K., H. Bernard, S. Ah-Leung, C. Créminon & J. M. Wal (2005b) Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 60, 658-64.
- Adel-Patient, K., C. Créminon, H. Bernard, G. Clément, L. Négroni, Y. Frobert, J. Grassi, J. M. Wal & J. M. Chatel (2000) Evaluation of a high IgE-responder mouse model of allergy to bovine beta-lactoglobulin (BLG): development of sandwich immunoassays for total and allergen-specific IgE, IgG1 and IgG2a in BLG-sensitized mice. *J Immunol Methods*, 235, 21-32.
- Adlerberth, I., E. Lindberg, N. Aberg, B. Hesselmar, R. Saalman, I. L. Strannegård & A. E. Wold (2006) Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res*, 59, 96-101.
- Akbari, O., J. L. Faul, E. G. Hoyte, G. J. Berry, J. Wahlström, M. Kronenberg, R. H. DeKruyff & D. T. Umetsu (2006) CD4<sup>+</sup> invariant T-cell-receptor<sup>+</sup> natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med*, 354, 1117-29.
- Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Grusby, R. H. DeKruyff & D. T. Umetsu (2003) Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 9, 582-8.
- Akbari, O. & D. T. Umetsu (2004) Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4, 533-8.
- Akdis, C. A., K. Blaser & M. Akdis (2004a) Genes of tolerance. *Allergy*, 59, 897-913.
- Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser

- & C. A. Akdis (2004b) Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 199, 1567-75.
- Akira, S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 15, 5-11.
- Alex, P., N. C. Zachos, T. Nguyen, L. Gonzales, T. E. Chen, L. S. Conklin, M. Centola & X. Li (2009) Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 341-52.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux & D. A. Stahl (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1919-25.
- Amoli, M. M., S. Hand, A. H. Hajeer, K. P. Jones, S. Rolf, C. Sting, B. H. Davies & W. E. Ollier (2002) Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy. *Genes Immun*, 3, 220-4.
- Ancelin. 2004. Allergies alimentaires. AFSSA.
- Arock, M. (2004) Similitudes et différences entre les mastocytes et le polynucléaire basophile. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 44, 23-36.
- Asano, T. (1969) Anion concentration in cecal content of germ-free and conventional mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 131, 1201-5.
- Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, I. I. Ivanov, Y. Umesaki, K. Itoh & K. Honda (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, 331, 337-41.
- Bach, J. F. (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 347, 911-20.
- Bahna, S. L. (2002) Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89, 56-60.
- Bashir, M. E., P. Andersen, I. J. Fuss, H. N. Shi & C. Nagler-Anderson (2002) An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J Immunol*, 169, 3284-92.
- Bashir, M. E., S. Louie, H. N. Shi & C. Nagler-Anderson (2004) Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol*, 172, 6978-87.
- Benhamou, A. H., M. G. Schäppi Tempia, D. C. Belli & P. A. Eigenmann (2009) An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly*, 139, 300-7.

- Bennet, R., M. Eriksson, N. Tafari & C. E. Nord (1991) Intestinal bacteria of newborn Ethiopian infants in relation to antibiotic treatment and colonisation by potentially pathogenic gram-negative bacteria. *Scand J Infect Dis*, 23, 63-9.
- Berin, M. C. & W. G. Shreffler (2008) T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 1311-20; quiz 1321-2.
- Berin, M. C., Y. Zheng, M. Domaradzki, X. M. Li & H. A. Sampson (2006) Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy*, 61, 64-71.
- Bezirtzoglou, E., A. Tsiotsias & G. W. Welling (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 17, 478-82.
- Biasucci, G., M. Rubini, S. Riboni, L. Morelli, E. Bessi & C. Retetangos (2010) Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*, 86 Suppl 1, 13-5.
- Bidat, E. (2006) Allergie alimentaire de l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 13, 1046-1051.
- Bik, E. M., P. B. Eckburg, S. R. Gill, K. E. Nelson, E. A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. J. Blaser & D. A. Relman (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 732-7.
- Bisgaard, H., N. Li, K. Bonnelykke, B. L. Chawes, T. Skov, G. Paludan-Müller, J. Stokholm, B. Smith & K. A. Krogfelt (2011) Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 646-52.e1-5.
- Björkstén, B., E. Sepp, K. Julge, T. Voor & M. Mikelsaar (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*, 108, 516-20.
- Blanc, F., H. Bernard, S. Alessandri, M. Bublin, E. Paty, S. A. Leung, K. A. Patient & J. M. Wal (2008) Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Mol Nutr Food Res*, 52 Suppl 2, S166-75.
- Blank, U., M. H. Jouvin, C. Guérin-Marchand & J. P. Kinet (2003) [The high-affinity IgE receptor: lessons from structural analysis]. *Med Sci (Paris)*, 19, 63-9.
- Bock, S. A., A. Muñoz-Furlong & H. A. Sampson (2007) Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 119, 1016-8.
- Bogiatzi, S. I., M. Guillot-Delost, A. Cappuccio, J. C. Bichet, O. Chouchane-Mlik, M. H. Donnadiou, E. Barillot, P. Hupé, K. Chlichlia, E. I. Efremidou, S. Aractingi, O. Bayrou & V. Soumelis (2012) Multiple-checkpoint inhibition of thymic stromal lymphopoietin-induced TH2 response by TH17-related cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 130, 233-40.e5.



- Bonnemaison, E., P. Lanotte, S. Cantagrel, S. Thionois, R. Quentin, C. Chamboux & J. Laugier (2003) Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*, 84, 304-10.
- Borchers, A. T., C. Selmi, F. J. Meyers, C. L. Keen & M. E. Gershwin (2009) Probiotics and immunity. *J Gastroenterol*, 44, 26-46.
- Bowman, C. C. & M. K. Selgrade (2008) Differences in allergenic potential of food extracts following oral exposure in mice reflect differences in digestibility: potential approaches to safety assessment. *Toxicol Sci*, 102, 100-9.
- Bradley R. E., H. Botero, J. Johnson, W. M. Reid (1967). Techniques in parasitology. I. Gnotobiotic poultry in plastic films isolators and some applications to parasitological research. *Exp. Parasitol*, 21, 402-413.
- Breiteneder, H. & C. Ebner (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 106, 27-36.
- Bromont, P. (1968) Technique d'élevage du lapin gnotobiotique. *Rec. Med. Vét.*, 144, -7. 22.
- Bry, L., P. G. Falk, T. Midtvedt & J. I. Gordon (1996) A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science*, 273, 1380-3.
- Bundoc, V. G. & A. Keane-Myers (2007) IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis. *Exp Eye Res*, 85, 575-9.
- Burns, R. C., T. J. Fairbanks, F. Sala, S. De Langhe, A. Mailleux, J. P. Thiery, C. Dickson, N. Itoh, D. Warburton, K. D. Anderson & S. Bellusci (2004) Requirement for fibroblast growth factor 10 or fibroblast growth factor receptor 2-IIIb signaling for cecal development in mouse. *Dev Biol*, 265, 61-74.
- Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont & M. J. Butel (2007) [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol*, 31, 533-42.
- Campos Alberto, E. J., N. Shimojo, Y. Suzuki, Y. Mashimo, T. Arima, T. Matsuura, Y. Inoue, A. Yamaide, M. Tomiita, K. Fujii, A. Hata & Y. Kohno (2008) IL-10 gene polymorphism, but not TGF-beta1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population. *Pediatr Allergy Immunol*, 19, 716-21.
- Cantani, A. & M. Micera (2004) Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 8, 153-64.
- Capobianco, F., C. Butteroni, B. Barletta, S. Corinti, C. Afferni, R. Tinghino, M. Boirivant & G. Di Felice (2008) Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions. *Int Immunol*, 20, 1077-86.
- Cerutti, A. & M. Rescigno (2008) The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28, 740-50.

- Chatchatee, P., K. M. Järvinen, L. Bardina, K. Beyer & H. A. Sampson (2001) Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 107, 379-83.
- Chehade, M. & L. Mayer (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, 115, 3-12; quiz 13.
- Chen, W. L., M. T. Hwang, C. Y. Liau, J. C. Ho, K. C. Hong & S. J. Mao (2005) Beta-lactoglobulin is a thermal marker in processed milk as studied by electrophoresis and circular dichroic spectra. *J Dairy Sci*, 88, 1618-30.
- Chung, H., S. J. Pamp, J. A. Hill, N. K. Surana, S. M. Edelman, E. B. Troy, N. C. Reading, E. J. Villablanca, S. Wang, J. R. Mora, Y. Umesaki, D. Mathis, C. Benoist, D. A. Relman & D. L. Kasper (2012) Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 149, 1578-93.
- Clarke, C. J., A. D. Wilson, N. A. Williams & C. R. Stokes (1991) Mucosal priming of T-lymphocyte responses to fed protein antigens using cholera toxin as an adjuvant. *Immunology*, 72, 323-8.
- Cohen, N. R., S. Garg & M. B. Brenner (2009) Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol*, 102, 1-94.
- Cong, Y., L. Wang, A. Konrad, T. Schoeb & C. O. Elson (2009) Curcumin induces the tolerogenic dendritic cell that promotes differentiation of intestine-protective regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 39, 3134-46.
- Coudeyras, S. & C. Forestier (2010) [Microbiota and probiotics: effects on human health]. *Can J Microbiol*, 56, 611-50.
- Cummings, J. H., G. R. Gibson & G. T. Macfarlane (1989) Quantitative estimates of fermentation in the hind gut of man. *Acta Vet Scand Suppl*, 86, 76-82.
- Daëron, M. (1997) Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*, 15, 203-34.
- Dearman, R. J. & I. Kimber (2007) A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods*, 41, 91-8.
- Dearman, R. J. & I. Kimber (2009) Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy*, 39, 458-68.
- Del Chierico, F., P. Vernocchi, L. Bonizzi, R. Carsetti, A. M. Castellazzi, B. Dallapiccola, W. de Vos, M. E. Guerzoni, M. Manco, G. L. Marseglia, M. Muraca, P. Roncada, G. Salvatori, F. Signore, A. Urbani & L. Putignani (2012) Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: The central role of combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics*.
- del Giudice, M. M., S. Leonardi, N. Maiello & F. P. Brunese (2010) Food allergy and probiotics in childhood. *J Clin Gastroenterol*, 44 Suppl 1, S22-5.

- deLaCochetière, M. F., C. Rougé, Dominique, Darmaun, J.-C. Rozé, G. Potel & C. G. Leguen (2007) Intestinal Microbiota in Neonates and Preterm Infants: A review. *Current Pediatric Reviews*, 3, 21-34.
- Deplancke, B. & H. R. Gaskins (2001) Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*, 73, 1131S-1141S.
- Derrien, M., M. C. Collado, K. Ben-Amor, S. Salminen & W. M. de Vos (2008) The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1646-8.
- Devey, M. E., K. J. Anderson, R. R. Coombs, M. J. Henschel & M. E. Coates (1976) The modified anaphylaxis hypothesis for cot death. Anaphylactic sensitization in guinea-pigs fed cow's milk. *Clin Exp Immunol*, 26, 542-8.
- Dombrowicz, D., S. Lin, V. Flamand, A. T. Brini, B. H. Koller & J. P. Kinet (1998) Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. *Immunity*, 8, 517-29.
- Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer & R. Knight (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11971-5.
- Donnadieu, E., M. H. Jouvin & J. P. Kinet (2000) A second amplifier function for the allergy-associated Fc(epsilon)RI-beta subunit. *Immunity*, 12, 515-23.
- Dreskin, S. C., A. Ayars, Y. Jin, D. Atkins, H. L. Leo & B. Song (2011) Association of genetic variants of CD14 with peanut allergy and elevated IgE levels in peanut allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 106, 170-2.
- Drozdowski, L. A., T. Clandinin, et al. (2010) Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol* 16(7): 787-99
- Ducluzeau, R., P. Raibaud (1989) Les interactions bactériennes dans le tube digestif *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.*, 8 (2), 291-311).
- Ducluzeau, R., P. Raibaud (1967) L'animal sans germe. Un instrument riche de promesse pour la recherche agronomique. *Cahier des Ingénieurs agronomes*, 214, 12-9 et 215,15-18.
- Du Toit, G., Y. Katz, P. Sasieni, D. Mesher, S. J. Maleki, H. R. Fisher, A. T. Fox, V. Turcanu, T. Amir, G. Zadik-Mnuhin, A. Cohen, I. Livne & G. Lack (2008) Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 984-91.
- Duncan, S. H., A. Belenguer, G. Holtrop, A. M. Johnstone, H. J. Flint & G. E. Lobley (2007) Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased

- concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1073-8.
- Dupont, C. (1997) Mécanismes physiopathologiques de l'allergie alimentaire. *Rev. fr. Allergol.*, 37, 1046-1051.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson & D. A. Relman (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-8.
- Ege, M. J., M. Mayer, A. C. Normand, J. Genuneit, W. O. Cookson, C. Braun-Fahrlander, D. Heederik, R. Piarroux, E. von Mutius & G. T. S. Group (2011) Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*, 364, 701-9.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres & R. M. Feather-Stone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009) EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the appropriate age for introduction of complementary feeding of infants. *EFSA Journal* 7:1423.
- Fallani, M., L. Rigottier-Gois, M. Aguilera, C. Bridonneau, A. Collignon, C. A. Edwards, G. Corthier & J. Doré (2006) Clostridium difficile and Clostridium perfringens species detected in infant faecal microbiota using 16S rRNA targeted probes. *J Microbiol Methods*, 67, 150-61.
- Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini & V. Vigi (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, 91, 48-55.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working group on Drafting Guidelines for the evaluation of Probiotics in Food.
- Farajzadeh, S., A. Shahesmaeili, N. Bazargan, Z. M. Poorkani, Z. Karaminejad, H. Aghaei & N. Pourdamghan (2011) Relationship between duration of breastfeeding and development of atopic dermatitis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 21, 80-86.
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. De Vos & A. D. Akkermans (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, 68, 219-26.
- Feary, J., J. Britton & J. Leonardi-Bee (2011) Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 66, 569-78.
- Fischer, R., J. R. McGhee, H. L. Vu, T. P. Atkinson, R. J. Jackson, D. Tomé & P. N. Boyaka (2005) Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy. *Am J Pathol*, 167, 1621-30.

- Foligne, B., S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poirer, J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier & B. Pot (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*, 13, 236-43.
- Forsythe, P. & J. Bienenstock (2010) Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest*, 39, 429-48.
- Francavilla, R., M. Calasso, L. Calace, S. Siragusa, M. Ndagijimana, P. Vernocchi, L. Brunetti, G. Mancino, G. Tedeschi, E. Guerzoni, F. Indrio, L. Laghi, V. L. Miniello, M. Gobbetti & M. De Angelis (2012) Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol*.
- Franchi, L., J. H. Park, M. H. Shaw, N. Marina-Garcia, G. Chen, Y. G. Kim & G. Núñez (2008) Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*, 10, 1-8.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz & N. R. Pace (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 13780-5.
- Franks, A. H., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut & G. W. Welling (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3336-45.
- Frossard, C. P., C. Hauser & P. A. Eigenmann (2004a) Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 377-82.
- Frossard, C. P., L. Tropia, C. Hauser & P. A. Eigenmann (2004b) Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 958-64.
- Furrie, E., M. Turner & S. Strobel (1995) The absence of gut flora has no effect on the induction of oral tolerance to ovalbumin. *Adv Exp Med Biol*, 371B, 1239-41.
- Gaboriau-Routhiau, V. & M. C. Moreau (1996) Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Pediatr Res*, 39, 625-9.
- Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, E. Lécuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paepe, G. Brandi, G. Eberl, J. Snel, D. Kelly & N. Cerf-Bensussan (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 31, 677-89.
- Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A. (1963) The classification of allergic

- reactions underlying disease. In eds. *Clinical Aspects of Immunology*, chapter 13. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 217–37.
- Geuking, M. B., J. Cahenzli, M. A. Lawson, D. C. Ng, E. Slack, S. Hapfelmeier, K. D. McCoy & A. J. Macpherson (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34, 794-806.
- Gilliland, M. G., J. R. Erb-Downward, C. M. Bassis, M. C. Shen, G. B. Toews, V. B. Young & G. B. Huffnagle (2012) Ecological succession of bacterial communities during conventionalization of germ-free mice. *Appl Environ Microbiol*, 78, 2359-66.
- Gonipeta, B., S. Parvataneni, R. J. Tempelman & V. Gangur (2009) An adjuvant-free mouse model to evaluate the allergenicity of milk whey protein. *J Dairy Sci*, 92, 4738-44.
- Gothefors, L. (1980) Symbiosis between host and microorganisms: neonatal colonization. *Scand J Infect Dis Suppl*, Suppl 24, 68-73.
- Greenberger, P. A. & A. M. Ditto (2012) Chapter 24: anaphylaxis. *Allergy Asthma Proc*, 33 Suppl 1, 80-3.
- Gri, G., S. Piconese, B. Frossi, V. Manfroi, S. Merluzzi, C. Tripodo, A. Viola, S. Odom, J. Rivera, M. P. Colombo & C. E. Pucillo (2008) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*, 29, 771-81.
- Guigoz, Y., J. Doré & E. J. Schiffrin (2008) The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 13-20.
- Gupta, R., A. Sheikh, D. P. Strachan & H. R. Anderson (2007) Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax*, 62, 91-6.
- Guédiche, M. N. (1990) Colonisation bactérienne du nouveau-né et infection. *Médecine du Maghreb*, 22.
- Hachem, P., M. Lisbonne, M. L. Michel, S. Diem, S. Roongapinun, J. Lefort, G. Marchal, A. Herbelin, P. W. Askenase, M. Dy & M. C. Leite-de-Moraes (2005) Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol*, 35, 2793-802.
- Halken, S. & A. Høst (2001) Prevention. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1, 229-36.
- Han, Y., J. Kim & K. Ahn (2012) Food allergy. *Korean J Pediatr*, 55, 153-8.
- Hand, S., C. Darke, J. Thompson, C. Stingl, S. Rolf, K. P. Jones & B. H. Davies (2004) Human leucocyte antigen polymorphisms in nut-allergic patients in South Wales. *Clin Exp Allergy*, 34, 720-4.
- Hansen, C. H., D. S. Nielsen, M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, T. Hudcovic, H. Tlaskalova-Hogenova & A. K. Hansen (2012) Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One*, 7, e34043.

- Hao, W. L. & Y. K. Lee (2004) Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol*, 268, 491-502.
- Harmsen, H. J., G. C. Raangs, T. He, J. E. Degener & G. W. Welling (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 68, 2982-90.
- Harmsen, H. J., A. C. Wildeboer-Veloo, J. Grijpstra, J. Knol, J. E. Degener & G. W. Welling (2000) Development of 16S rRNA-based probes for the Coriobacterium group and the Atopobium cluster and their application for enumeration of Coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4523-7.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy & C. T. Weaver (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6, 1123-32.
- Hayashi, H., M. Sakamoto & Y. Benno (2002) Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol*, 46, 819-31.
- Hazebrouck, S., R. Oozeer, K. Adel-Patient, P. Langella, S. Rabot, J. M. Wal & G. Corthier (2006) Constitutive delivery of bovine beta-lactoglobulin to the digestive tracts of gnotobiotic mice by engineered *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7460-7.
- Hazebrouck, S., L. Pothelune, V. Azevedo, G. Corthier, J. M. Wal & P. Langella (2007) Efficient production and secretion of bovine beta-lactoglobulin by *Lactobacillus casei*. *Microb Cell Fact*, 6, 12.
- Hazebrouck, S., L. Przybylski-Nicaise, S. Ah-Leung, K. Adel-Patient, G. Corthier, P. Langella & J. M. Wal (2009a) Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine beta-lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine*, 27, 5800-5.
- Hazebrouck, S., L. Przybylski-Nicaise, S. Ah-Leung, K. Adel-Patient, G. Corthier, J. M. Wal & S. Rabot (2009b) Allergic sensitization to bovine beta-lactoglobulin: comparison between germ-free and conventional BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 148, 65-72.
- Hegazi, F. Z. (1987) Proteolytic activity of lactic acid bacteria in skim milk with special reference to the biodegradation of casein fractions. *Nahrung*, 31, 19-26.
- Helm, R. M. & A. W. Burks (2002) Animal models of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2, 541-6.
- Herz, U., H. Renz & U. Wiedermann (2004) Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods*, 32, 271-80.

- Hill, M. J. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*, 6 Suppl 1, S43-5.
- Hisatsune, T., K. Nishijima, M. Kohyama, H. Kato & S. Kaminogawa (1995) CD8+ T cells specific to the exogenous antigen. Mode of antigen recognition and possible implication in immunosuppression. *J Immunol*, 154, 88-96.
- HJ Harmsen, P. E., F Schut, GW Welling (1999) A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microb Ecol Health Dis*, 11, 3-12.
- Hoeksma, A. & K. C. Winkler (1963) The normal flora of the nose in twins. *Acta Leiden*, 32, 123-33.
- Hollingsworth, J. W., S. Maruoka, K. Boon, S. Garantziotis, Z. Li, J. Tomfohr, N. Bailey, E. N. Potts, G. Whitehead, D. M. Brass & D. A. Schwartz (2008) In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest*, 118, 3462-9.
- Hong, X., G. Wang, X. Liu, R. Kumar, H. J. Tsai, L. Arguelles, K. Hao, C. Pearson, K. Ortiz, A. Bonzagni, S. Apollon, L. Fu, D. Caruso, J. A. Pongratic, R. Schleimer, P. G. Holt, H. Bauchner & X. Wang (2011) Gene polymorphisms, breast-feeding, and development of food sensitization in early childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 374-81.e2.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk & J. I. Gordon (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291, 881-4.
- Hourihane, J. O., R. Aiken, R. Briggs, L. A. Gudgeon, K. E. Grimshaw, A. DunnGalvin & S. R. Roberts (2007) The impact of government advice to pregnant mothers regarding peanut avoidance on the prevalence of peanut allergy in United Kingdom children at school entry. *J Allergy Clin Immunol*, 119, 1197-202.
- Howell, W. M., S. J. Turner, J. O. Hourihane, T. P. Dean & J. O. Warner (1998) HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: evidence from a family-based and case-control study. *Clin Exp Allergy*, 28, 156-62.
- Hrncir, T., R. Stepankova, H. Kozakova, T. Hudcovic & H. Tlaskalova-Hogenova (2008) Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunol*, 9, 65.
- Huffnagle, G. B. (2010) The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog*, 6, e1000549.
- Huurre, A., M. Kalliomäki, S. Rautava, M. Rinne, S. Salminen & E. Isolauri (2008) Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*, 93, 236-40.
- Høst, A. (2002) Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89, 33-7.



- Ishikawa, H., K. Tanaka, Y. Maeda, Y. Aiba, A. Hata, N. M. Tsuji, Y. Koga & T. Matsumoto (2008) Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol*, 153, 127-35.
- Ishizaka, K., T. Ishizaka & M. M. Hornbrook (1966) Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*, 97, 75-85.
- Isolauri, E. (2012) Development of healthy gut microbiota early in life. *J Paediatr Child Health*, 48 Suppl 3, 1-6.
- Isolauri, E., T. Arvola, Y. Sütas, E. Moilanen & S. Salminen (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*, 30, 1604-10.
- Ivanov, I. I., K. Atarashi, N. Manel, E. L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K. C. Goldfarb, C. A. Santee, S. V. Lynch, T. Tanoue, A. Imaoka, K. Itoh, K. Takeda, Y. Umesaki, K. Honda & D. R. Littman (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485-98.
- Ivanov, I. I., L. Zhou & D. R. Littman (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*, 19, 409-17.
- Janeway C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 54(Pt 1), 1-13.
- Johansson, M. A., Y. M. Sjögren, J. O. Persson, C. Nilsson & E. Sverremark-Ekström (2011) Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS One*, 6, e23031.
- Johansson, S. G. & H. Bennich (1967) Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, 13, 381-94.
- Johansson, S. G., T. Bieber, R. Dahl, P. S. Friedmann, B. Q. Lanier, R. F. Lockey, C. Motala, J. A. Ortega Martell, T. A. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge & H. C. Williams (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 832-6.
- Johansson, S. G., J. O. Hourihane, J. Bousquet, C. Bruijnzeel-Koomen, S. Dreborg, T. Haahtela, M. L. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, P. van Cauwenberge, M. van Hage-Hamsten, B. Wüthrich & E. t. E. A. o. A. a. C. I. n. t. force (2001) A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56, 813-24.
- Jyonouchi, H. (2008) Non-IgE mediated food allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 7, 173-80.
- Järvinen, K. M., K. Beyer, L. Vila, P. Chatchatee, P. J. Busse & H. A. Sampson (2002) B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 110, 293-7.

- Kalliomäki, M., P. Kirjavainen, E. Eerola, P. Kero, S. Salminen & E. Isolauri (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*, 107, 129-34.
- Kashyap, M., A. M. Thornton, S. K. Norton, B. Barnstein, M. Macey, J. Brenzovich, E. Shevach, W. J. Leonard & J. J. Ryan (2008) Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol*, 180, 2039-43.
- Kennedy Norton, S., B. Barnstein, J. Brenzovich, D. P. Bailey, M. Kashyap, K. Speiran, J. Ford, D. Conrad, S. Watowich, M. R. Moralle, C. L. Kepley, P. J. Murray & J. J. Ryan (2008) IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. *J Immunol*, 180, 2848-54.
- Kibe, R., M. Sakamoto, H. Yokota & Y. Benno (2007) Characterization of the inhabitancy of mouse intestinal bacteria (MIB) in rodents and humans by real-time PCR with group-specific primers. *Microbiol Immunol*, 51, 349-57.
- Kim, J. S., A. Nowak-Węgrzyn, S. H. Sicherer, S. Noone, E. L. Moshier & H. A. Sampson (2011) Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 125-131.e2.
- Kinet, J. P. (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*, 17, 931-72.
- Kirk, R. G. (2012) "Standardization through Mechanization" Germ-Free Life and the Engineering of the Ideal Laboratory Animal. *Technol Cult*, 53(1): 61–93.
- Knol, E. F., F. P. Mul, W. J. Lie, A. J. Verhoeven & D. Roos (1996) The role of basophils in allergic disease. *Eur Respir J Suppl*, 22, 126s-131s.
- Koplin JJ, Osborne NJ, Wake M, Martin PE, Gurrin LC, Robinson MN, Tey D, Slaa M, Thiele L, Miles L, Anderson D, Tan T, Dang TD, Hill DJ, Lowe AJ, Matheson MC, Ponsonby AL, Tang ML, Dharmage SC, Allen KJ et al (2010). Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *J Allergy Clin Immunol*, 126:807–813.
- Kronenberg, M. (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*, 23, 877-900.
- Kurokawa, K., T. Itoh, T. Kuwahara, K. Oshima, H. Toh, A. Toyoda, H. Takami, H. Morita, V. K. Sharma, T. P. Srivastava, T. D. Taylor, H. Noguchi, H. Mori, Y. Ogura, D. S. Ehrlich, K. Itoh, T. Takagi, Y. Sakaki, T. Hayashi & M. Hattori (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*, 14, 169-81.
- Lack, G. (2008) Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 1331-6.
- Ladics, G. S., L. M. Knippels, A. H. Penninks, G. A. Bannon, R. E. Goodman & C. Herouet-Guicheney (2010) Review of animal models designed to predict the potential

- allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regul Toxicol Pharmacol*, 56, 212-24.
- Lai, Y. & R. L. Gallo (2008) Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets*, 8, 144-55.
- Lam, H. Y., E. van Hoffen, A. Michelsen, K. Guikers, C. H. van der Tas, C. A. Bruijnzeel-Koomen & A. C. Knulst (2008) Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin Exp Allergy*, 38, 995-1002.
- Langendijk, P. S., F. Schut, G. J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson & G. W. Welling (1995) Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3069-75.
- Langhendries, J. P., P. Maton, A. François, A. Marguglio, W. Marion, S. Smeets & P. Philippet (2010) [Implementation of the intestinal micro flora in the early stage and adequate immunity later on]. *Arch Pediatr*, 17 Suppl 3, S110-8.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein & D. J. Cua (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201, 233-40.
- Lantz, C. S., M. Yamaguchi, H. C. Oettgen, I. M. Katona, I. Miyajima, J. P. Kinet & S. J. Galli (1997) IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. *J Immunol*, 158, 2517-21.
- Lathrop, S. K., S. M. Bloom, S. M. Rao, K. Nutsch, C. W. Lio, N. Santacruz, D. A. Peterson, T. S. Stappenbeck & C. S. Hsieh (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, 478, 250-4.
- Le Huërou-Luron, I., S. Blat & G. Boudry (2010) Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev*, 23, 23-36.
- Leclerc, M., C. Juste, H. Blotière & J. Doré (2007) Microbiote intestinale: un univers méconnu. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 22-27.
- Lefrançois, L. & T. Goodman (1989) In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR-gamma delta+ intraepithelial lymphocytes. *Science*, 243, 1716-8.
- Lehrer, S. B. & S. McClain (2009) Utility of animal models for predicting human allergenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 54, S46-51.
- Ley, R. E., D. A. Peterson & J. I. Gordon (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124, 837-48.
- Li, X. M., B. H. Schofield, C. K. Huang, G. I. Kleiner & H. A. Sampson (1999) A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 206-14.

- Li, X. M., D. Serebrisky, S. Y. Lee, C. K. Huang, L. Bardina, B. H. Schofield, J. S. Stanley, A. W. Burks, G. A. Bannon & H. A. Sampson (2000) A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*, 106, 150-8.
- Lin, S., C. Cicala, A. M. Scharenberg & J. P. Kinet (1996) The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. *Cell*, 85, 985-95.
- Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L. M. Araujo, P. Hachem, J. M. Fournau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B. B. Vargaftig, A. Herbelin & M. C. Leite-de-Moraes (2003) Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol*, 171, 1637-41.
- Liu, A. H., R. Jaramillo, S. H. Sicherer, R. A. Wood, S. A. Bock, A. W. Burks, M. Massing, R. D. Cohn & D. C. Zeldin (2010) National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*, 126, 798-806.e13.
- Liu, X., T. H. Beaty, P. Deindl, S. K. Huang, S. Lau, C. Sommerfeld, M. D. Fallin, W. H. Kao, U. Wahn & R. Nickel (2004) Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 489-95.
- Liu, Y. J. (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*, 23, 275-306.
- Lodinová-Zádníková, R., L. Prokesová, H. Tlaskalová, I. Kocourková, J. Zizka & Z. Stranák (2004) [Influence of oral colonization with probiotic E. coli strain after birth on frequency of recurrent infections, allergy and development of some immunologic parameters. Long-term studies]. *Ceska Gynekol*, 69 Suppl 1, 91-7.
- Lorentz, A., S. Schwengberg, G. Sellge, M. P. Manns & S. C. Bischoff (2000) Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol*, 164, 43-8.
- Lorenz, M. (2001) The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol*, 3, 1-11.
- Macdonald, T. T. & G. Monteleone (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 307, 1920-5.
- MacGlashan, D. W., B. S. Bochner, D. C. Adelman, P. M. Jardieu, A. Togias, J. McKenzie-White, S. A. Sterbinsky, R. G. Hamilton & L. M. Lichtenstein (1997) Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol*, 158, 1438-45.

- Macpherson, A. J., M. B. Geuking & K. D. McCoy (2005) Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*, 115, 153-62.
- Macpherson, A. J. & N. L. Harris (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4, 478-85.
- Malmberg, L. P., K. M. Saarinen, A. S. Pelkonen, E. Savilahti & M. J. Mäkelä (2010) Cow's milk allergy as a predictor of bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation at school age. *Clin Exp Allergy*, 40, 1491-7.
- Malveaux, F. J., M. C. Conroy, N. F. Adkinson & L. M. Lichtenstein (1978) IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J Clin Invest*, 62, 176-81.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt & K. H. Schleifer (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142 ( Pt 5), 1097-106.
- Mariat, D., O. Firmesse, F. Levenez, V. Guimarães, H. Sokol, J. Doré, G. Corthier & J. P. Furet (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 9, 123.
- Marinaro, M., H. F. Staats, T. Hiroi, R. J. Jackson, M. Coste, P. N. Boyaka, N. Okahashi, M. Yamamoto, H. Kiyono, H. Bluethmann, K. Fujihashi & J. R. McGhee (1995) Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J Immunol*, 155, 4621-9.
- Marteau, P., P. Pochart, J. Doré, C. Béra-Maillet, A. Bernalier & G. Corthier (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4939-42.
- Marwaha, A. K., N. J. Leung, A. N. McMurchy & M. K. Levings (2012) TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol*, 3, 129.
- Maurer, D., S. Fiebiger, C. Ebner, B. Reininger, G. F. Fischer, S. Wichlas, M. H. Jouvin, M. Schmitt-Egenolf, D. Kraft, J. P. Kinet & G. Stingl (1996) Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol*, 157, 607-16.
- Mazmanian, S. K., C. H. Liu, A. O. Tzianabos & D. L. Kasper (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107-18.
- Mazé, A., G. Boël, M. Zúñiga, A. Bourand, V. Loux, M. J. Yebra, V. Monedero, K. Correia, N. Jacques, S. Beaufils, S. Poncet, P. Joyet, E. Milohanic, S. Casarégola, Y. Auffray, G. Pérez-Martínez, J. F. Gibrat, M. Zagorec, C. Francke, A. Hartke & J. Deutscher (2010) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol*, 192, 2647-8.

- McDonald, C., N. Inohara & G. Nuñez (2005) Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem*, 280, 20177-80.
- McKeever, T. M., S. A. Lewis, C. Smith, J. Collins, H. Heatlie, M. Frischer & R. Hubbard (2002) Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol*, 109, 43-50.
- McLoughlin, R. M. & K. H. Mills (2011) Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 1097-107; quiz 1108-9.
- McNeish, A.S. (1984) Enzymatic Maturation of the Gastrointestinal Tract and its Relevance to Food Allergy and Intolerance in Infancy. *Ann Allergy* 53: 643.
- Meiler, F., S. Klunker, M. Zimmermann, C. A. Akdis & M. Akdis (2008) Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*, 63, 1455-63.
- Menezes, J. S., D. S. Mucida, D. C. Cara, J. I. Alvarez-Leite, M. Russo, N. M. Vaz & A. M. de Faria (2003) Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*, 15, 447-55.
- Metz, M., and Maurer, M. (2009). Innate immunity and allergy in the skin. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 687–693.
- Michail, S. (2009) The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 5, 5.
- Min, B., A. Thornton, S. M. Caucheteux, S. A. Younes, K. Oh, J. Hu-Li & W. E. Paul (2007) Gut flora antigens are not important in the maintenance of regulatory T cell heterogeneity and homeostasis. *Eur J Immunol*, 37, 1916-23.
- Moneret-Vautrin, D.-A. (2008) Epidémiologie de l'allergie alimentaire. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 48, 171-178.
- Morafo, V., K. Srivastava, C. K. Huang, G. Kleiner, S. Y. Lee, H. A. Sampson & A. M. Li (2003) Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 1122-8.
- Moreau, M. C. & G. Corthier (1988) Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infect Immun*, 56, 2766-8.
- Moreau, M. C. & V. Gaboriau-Routhiau (1996) The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res Immunol*, 147, 49-59.

- Morin, S., H. Bernard, L. Przybylski-Nicaise, G. Corthier, S. Rabot, J. M. Wal & S. Hazebrouck (2011) Allergenic and immunogenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Mol Nutr Food Res*, 55, 1700-7.
- Mullins, R. J. (2007) Paediatric food allergy trends in a community-based specialist allergy practice, 1995-2006. *Med J Aust*, 186, 618-21.
- Murphy, K. M. & S. L. Reiner (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*, 2, 933-44.
- Nagano, Y., K. Itoh & K. Honda (2012) The induction of Treg cells by gut-indigenous Clostridium. *Curr Opin Immunol*.
- Nakamura, K., A. Kitani & W. Strober (2001) Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194, 629-44.
- Nakamura, Y., I. Oki, S. Tanihara, T. Ojima, T. Kuwano, M. Tsukada, M. Momose, M. Kobayashi & H. Yanagawa (1999) [Relationship between breast milk and atopic dermatitis in children]. *Nihon Koshu Eisei Zasshi*, 46, 298-303.
- Nakayama, J., T. Kobayashi, S. Tanaka, Y. Korenori, A. Tateyama, N. Sakamoto, C. Kiyohara, T. Shirakawa & K. Sonomoto (2011) Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63, 397-406.
- Namkung, J. H., J. E. Lee, E. Kim, H. J. Cho, S. Kim, E. S. Shin, E. Y. Cho & J. M. Yang (2007) IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans. *Allergy*, 62, 934-42.
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, et al. (2010) Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464(7293): 1367–1370.
- Neutra, M. R. (1998) 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*, 274, G785-91.
- Ngoc, P. L., L. P. Ngoc, D. R. Gold, A. O. Tzianabos, S. T. Weiss & J. C. Celedón (2005) Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5, 161-6.
- Niess, J. H. & G. Adler (2010) Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol*, 184, 2026-37.
- Novak, N., C. Tepel, S. Koch, K. Brix, T. Bieber & S. Kraft (2003) Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest*, 111, 1047-56.

- Noverr, M. C. & G. B. Huffnagle (2005) The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, 35, 1511-20.
- Nowak-Węgrzyn, A., K. A. Bloom, S. H. Sicherer, W. G. Shreffler, S. Noone, N. Wanich & H. A. Sampson (2008) Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 342-7, 347.e1-2.
- Nowak-Węgrzyn, A. & H. A. Sampson (2011) Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 558-73; quiz 574-5.
- O'Garra, A. & P. Vieira (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*, 10, 801-5.
- O'Hara, A. M. & F. Shanahan (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7, 688-93.
- Okahashi, N., M. Yamamoto, J. L. Vancott, S. N. Chatfield, M. Roberts, H. Bluethmann, T. Hiroi, H. Kiyono & J. R. McGhee (1996) Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant Salmonella strain or cholera toxin reveals that CD4<sup>+</sup> Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun*, 64, 1516-25.
- Ostman, S., C. Rask, A. E. Wold, S. Hultkrantz & E. Telemo (2006) Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur J Immunol*, 36, 2336-46.
- Ozdemir, C., M. Akdis & C. A. Akdis (2009) T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy*, 39, 626-39.
- Paajanen, L., T. Tuure, T. Poussa & R. Korpela (2003) No difference in symptoms during challenges with homogenized and unhomogenized cow's milk in subjects with subjective hypersensitivity to homogenized milk. *J Dairy Res*, 70, 175-9.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian & C. Dong (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6, 1133-41.
- Pei, Z., E. J. Bini, L. Yang, M. Zhou, F. Francois & M. J. Blaser (2004) Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4250-5.
- Penders, J., E. E. Stobberingh, P. A. van den Brandt & C. Thijs (2007) The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*, 62, 1223-36.
- Perrier, C., A. C. Thierry, A. Mercenier & B. Corthésy (2010) Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin Exp Allergy*, 40, 153-62.
- Peterson, D. A., D. N. Frank, N. R. Pace & J. I. Gordon (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, 3, 417-27.



- Pham-Thi, N., J. de Blic, M. Le Bourgeois, M. Dy, P. Scheinmann & M. C. Leite-de-Moraes (2006) Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 217-8.
- Pichavant M, Delneste Y, Jeannin P, Fourneau C, Bricet A, et al. (2003) Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J Immunol* 171: 6697–6705.
- Poroyko, V., M. Morowitz, T. Bell, A. Ulanov, M. Wang, S. Donovan, N. Bao, S. Gu, L. Hong, J. C. Alverdy, J. Bergelson & D. C. Liu (2011) Diet creates metabolic niches in the "immature gut" that shape microbial communities. *Nutr Hosp*, 26, 1283-95.
- Prakash, S., L. Rodes, M. Coussa-Charley & C. Tomaro-Duchesneau (2011) Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5, 71-86.
- Prescott, S. & K. J. Allen (2011) Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol*, 22, 155-60.
- Prescott, S. & R. Saffery (2011) The role of epigenetic dysregulation in the epidemic of allergic disease. *Clin Epigenetics*, 2, 223-232.
- Prescott, S. L. (2011) The influence of early environmental exposures on immune development and subsequent risk of allergic disease. *Allergy*, 66 Suppl 95, 4-6.
- Prescott, S. L., J. A. Dunstan, J. Hale, L. Breckler, H. Lehmann, S. Weston & P. Richmond (2005) Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 35, 1557-64.
- Prioult, G. & C. Nagler-Anderson (2005) Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev*, 206, 204-18.
- Purvis, D. J., J. M. Thompson, P. M. Clark, E. Robinson, P. N. Black, C. J. Wild & E. A. Mitchell (2005) Risk factors for atopic dermatitis in New Zealand children at 3.5 years of age. *Br J Dermatol*, 152, 742-9.
- Putignani, L., R. Carsetti, F. Signore & M. Manco (2010) Additional maternal and nonmaternal factors contribute to microbiota shaping in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, E159; author reply E160.
- Pürschel, M. & C. Pollack (1972) [Proteolytic degradation of milk proteins by bacteria. 2. The action of psychrophilic and lactic acid producing bacteria on the proteins in milk]. *Nahrung*, 16, 451-9.
- Raibaud, P. & R. Ducluzeau (1989) Etude de la colonisation bactérienne du tractus-gastro-intestinal à l'aide de modèle expérimentaux. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 8, 361-373.

- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg & R. Medzhitov (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-41.
- Rawls, J. F., B. S. Samuel & J. I. Gordon (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4596-601.
- Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler & M. Friede (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol*, 30, 23-32.
- Reid, G., J. A. Younes, H. C. Van der Mei, G. B. Gloor, R. Knight & H. J. Busscher (2011) Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 9, 27-38.
- Renauld, J.-C. (2002) Les mécanismes immunitaires impliqués dans l'allergie alimentaire. *Louvain Med.*, 121, 241-245.
- Repa, A., H. Kozakova, T. Hudcovic, R. Stepankova, T. Hrnčíř, H. Tlaskalová-Hogenová, A. Pollak & U. Wiedermann (2008) Susceptibility to nasal and oral tolerance induction to the major birch pollen allergen Bet v 1 is not dependent on the presence of the microflora. *Immunol Lett*, 117, 50-6.
- Reyniers, J. A. (1959) Design and Operation of Apparatus for Rearing Germfree Animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 78:47-79).
- Rigottier-Gois, L., A. G. Bourhis, G. Gramet, V. Rochet & J. Doré (2003) Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, 237-45.
- Rochat, T., L. Bermúdez-Humarán, J. J. Gratadoux, C. Fourage, C. Hoebler, G. Corthier & P. Langella (2007) Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact*, 6, 22.
- Rodriguez, B., G. Prioult, R. Bibiloni, I. Nicolis, A. Mercenier, M. J. Butel & A. J. Waligora-Dupriet (2011) Germ-free status and altered caecal subdominant microbiota are associated with a high susceptibility to cow's milk allergy in mice. *FEMS Microbiol Ecol*, 76, 133-44.
- Romagnani, S. (1994) Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 12, 227-57.
- Romagnani, S. (2004) Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 395-400.
- Romagnani, S. (2006) Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*, 36, 1357-66.
- Rona, R. J., T. Keil, C. Summers, D. Gislason, L. Zuidmeer, E. Sodergren, S. T. Sigurdardottir, T. Lindner, K. Goldhahn, J. Dahlstrom, D. McBride & C. Madsen

- (2007) The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 638-46.
- Rook, G. A. & L. R. Brunet (2005) Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*, 54, 317-20.
- Ruiter, B., E. H. Rozemuller, A. J. van Dijk, J. Garssen, C. A. Bruijnzeel-Koomen, M. G. Tilanus, E. F. Knol & E. van Hoffen (2007) Role of human leucocyte antigen DQ in the presentation of T cell epitopes in the major cow's milk allergen alphas1-casein. *Int Arch Allergy Immunol*, 143, 119-26.
- Ruiz, R. G., D. M. Kemeny & J. F. Price (1992) Higher risk of infantile atopic dermatitis from maternal atopy than from paternal atopy. *Clin Exp Allergy*, 22, 762-6.
- Saenz, S. A., Noti, M., and Artis, D. (2010). Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends Immunol.* 31, 407–413.
- Salzman, N. H., H. de Jong, Y. Paterson, H. J. Harmsen, G. W. Welling & N. A. Bos (2002) Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148, 3651-60.
- Saunier, K., C. Rougé, C. Lay, L. Rigottier-Gois & J. Doré (2005) Enumeration of bacteria from the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota using Clep1156 16S rRNA probe in combination with helper and competitor oligonucleotides. *Syst Appl Microbiol*, 28, 454-64.
- Savage, D. C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 31, 107-33.
- Schenk, M., A. Bouchon, S. Birrer, M. Colonna & C. Mueller (2005) Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J Immunol*, 174, 517-24.
- Schloss, P. D. & J. Handelsman (2004) Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 686-91.
- Schmidt, B., I. E. Mulder, C. C. Musk, R. I. Aminov, M. Lewis, C. R. Stokes, M. Bailey, J. I. Prosser, B. P. Gill, J. R. Pluske & D. Kelly (2011) Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS One*, 6, e28284.
- Schnitzler, A. C., J. M. Burke & L. M. Wetzler (2007) Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells. *Infect Immun*, 75, 3150-9.
- Schouten, B., B. C. van Esch, G. A. Hofman, L. Boon, L. M. Knippels, L. E. Willemsen & J. Garssen (2010) Oligosaccharide-induced whey-specific CD25(+) regulatory T-cells are involved in the suppression of cow milk allergy in mice. *J Nutr*, 140, 835-41.
- Schouten, B., B. C. van Esch, G. A. Hofman, L. W. van den Elsen, L. E. Willemsen & J. Garssen (2008) Acute allergic skin reactions and intestinal contractility changes in mice orally sensitized against casein or whey. *Int Arch Allergy Immunol*, 147, 125-34.

- Schouten, B., B. C. van Esch, G. A. Hofman, S. A. van Doorn, J. Knol, A. J. Nauta, J. Garssen, L. E. Willemsen & L. M. Knippels (2009) Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. *J Nutr*, 139, 1398-403.
- Schouten, B., B. C. van Esch, S. M. Lim, G. A. Hofman, L. M. Knippels, L. E. Willemsen, A. P. Vos & J. Garssen (2012) Invariant Natural Killer T Cells Contribute to the Allergic Response in Cow's Milk Protein-Sensitized Mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 159, 51-59.
- Schroder, N. W. J. (2009) The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 38–43.
- Schumann, A., S. Nutten, D. Donnicola, E. M. Comelli, R. Mansourian, C. Cherbut, I. Cortesey-Theulaz & C. Garcia-Rodenas (2005) Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics*, 23, 235-45.
- Schäfer, T., E. Böhler, S. Ruhdorfer, L. Weigl, D. Wessner, J. Heinrich, B. Filipiak, H. E. Wichmann & J. Ring (2001) Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy*, 56, 1172-9.
- Sekirov, I., S. L. Russell, L. C. Antunes & B. B. Finlay (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90, 859-904.
- Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian & J. Doré (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52, 237-42.
- Sen, Y., B. Yongyi, H. Yuling, X. Luokun, H. Li, X. Jie, D. Tao, Z. Gang, L. Junyan, H. Chunsong, X. Zhang, J. Youxin, G. Feili, J. Boquan & T. Jinquan (2005) V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement. *J Immunol*, 175, 4914-26.
- Sepp, E., K. Julge, M. Vasar, P. Naaber, B. Björkstén & M. Mikelsaar (1997) Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr*, 86, 956-61.
- Sghir, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart & J. Dore (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2263-6.
- Shah, A. (2012) The Pathologic and Clinical Intersection of Atopic and Autoimmune Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*.
- Shek, L. P., L. Bardina, R. Castro, H. A. Sampson & K. Beyer (2005) Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy*, 60, 912-9.

- Shirai, Y., M. Hashimoto, R. Kato, Y. I. Kawamura, T. Kirikae, H. Yano, J. Takashima, Y. Kirihara, Y. Saito, M. A. Fujino & T. Dohi (2004) Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: low MD-2 mRNA expression in colonic macrophages. *J Clin Immunol*, 24, 42-52.
- Shoenfeld, Y. & N. Agmon-Levin (2011) 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun*, 36, 4-8.
- Sicherer, S. H., T. J. Furlong, H. H. Maes, R. J. Desnick, H. A. Sampson & B. D. Gelb (2000) Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol*, 106, 53-6.
- Sicherer, S. H. & D. Y. Leung (2012) Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2011. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 76-85.
- Sicherer, S. H., A. Muñoz-Furlong, J. H. Godbold & H. A. Sampson (2010) US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 1322-6.
- Sjögren, Y. M., M. C. Jenmalm, M. F. Böttcher, B. Björkstén & E. Sverremark-Ekström (2009) Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy*, 39, 518-26.
- Skripak, J. M., E. C. Matsui, K. Mudd & R. A. Wood (2007) The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 1172-7.
- Spellberg, B. & J. E. Edwards (2001) Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 32, 76-102.
- Srikanth, C. V. & B. A. McCormick (2008) Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2008, 626827.
- Stanghellini, V., G. Barbara, C. Cremon, R. Cogliandro, A. Antonucci, V. Gabusi, C. Frisoni, R. De Giorgio, V. Grasso, M. Serra & R. Corinaldesi (2010) Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med*, 5 Suppl 1, S57-63.
- Stewart, J. A., V. S. Chadwick & A. Murray (2005) Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J Med Microbiol*, 54, 1239-42.
- Strachan, D. P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299, 1259-60.
- Strauch, U. G., F. Obermeier, N. Grunwald, S. Gürster, N. Dunger, M. Schultz, D. P. Griese, M. Mähler, J. Schölmerich & H. C. Rath (2005) Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut*, 54, 1546-52.

- Strid, J., J. Hourihane, I. Kimber, R. Callard & S. Strobel (2005) Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*, 35, 757-66.
- Strobel, S. & A. M. Mowat (1998) Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today*, 19, 173-81.
- Sudo, N., S. Sawamura, K. Tanaka, Y. Aiba, C. Kubo & Y. Koga (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol*, 159, 1739-45.
- Suzuki, K., B. Meek, Y. Doi, M. Muramatsu, T. Chiba, T. Honjo & S. Fagarasan (2004) Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1981-6.
- Swidsinski, A., V. Loening-Baucke, F. Theissig, H. Engelhardt, S. Bengmark, S. Koch, H. Lochs & Y. Dörffel (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*, 56, 343-50.
- Szajewska, H. (2012) Early nutritional strategies for preventing allergic disease. *Isr Med Assoc J*, 14, 58-62.
- Sélo, I., G. Clément, H. Bernard, J. Chatel, C. Créminon, G. Peltre & J. Wal (1999) Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy*, 29, 1055-63.
- Tang, Y., S. P. Guan, B. Y. Chua, Q. Zhou, A. W. Ho, K. H. Wong, K. L. Wong, W. S. Wong & D. M. Kemeny (2012) Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- $\gamma$  and dendritic cell function. *J Allergy Clin Immunol*, 129, 1611-1620.e4.
- Thompson-Chagoyan, O. C., J. M. Vieites, J. Maldonado, C. Edwards & A. Gil (2010) Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy--a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol*, 21, e394-400.
- Toru, H., C. Ra, S. Nonoyama, K. Suzuki, J. Yata & T. Nakahata (1996) Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol*, 8, 1367-73.
- Trexler, P. C., Reynolds L. I. (1957) Flexible Film Apparatus for the Rearing and Use of Germfree Animals. *Applied Microbiology*, 5:406-12).
- Tsuji, N. M. & A. Kosaka (2008) Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol*, 29, 532-40.
- Turnbaugh, P. J., F. Bäckhed, L. Fulton & J. I. Gordon (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3, 213-23.
- Turvey S. E., Broide D. H. (2010). Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 S24-S32.

- Untersmayr, E., G. Bises, P. Starkl, C. L. Bevins, O. Scheiner, G. Boltz-Nitulescu, F. Wrba & E. Jensen-Jarolim (2010) The high affinity IgE receptor Fc epsilonRI is expressed by human intestinal epithelial cells. *PLoS One*, 5, e9023.
- Untersmayr, E. & E. Jensen-Jarolim (2006) Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol Ther*, 112, 787-98.
- Vael, C. & K. Desager (2009) The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*, 21, 794-800.
- Vael, C., V. Nelen, S. L. Verhulst, H. Goossens & K. N. Desager (2008) Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm Med*, 8, 19.
- Vael, C., L. Vanheirstraeten, K. N. Desager & H. Goossens (2011) Denaturing gradient gel electrophoresis of neonatal intestinal microbiota in relation to the development of asthma. *BMC Microbiol*, 11, 68.
- Vajdy, M., M. H. Kosco-Vilbois, M. Kopf, G. Köhler & N. Lycke (1995) Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med*, 181, 41-53.
- Vajdy, M. & N. Y. Lycke (1992) Cholera toxin adjuvant promotes long-term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization. *Immunology*, 75, 488-92.
- Van de Merwe, J. P., J. H. Stegeman & M. P. Hazenberg (1983) The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 119-24.
- van Duin, D., R. Medzhitov & A. C. Shaw (2006) Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol*, 27, 49-55.
- van Tongeren, S. P., J. P. Slaets, H. J. Harmsen & G. W. Welling (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol*, 71, 6438-42.
- van Wijk, F., E. J. Wehrens, S. Nierkens, L. Boon, A. Kasran, R. Pieters & L. M. Knippels (2007) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells regulate the intensity of hypersensitivity responses to peanut, but are not decisive in the induction of oral sensitization. *Clin Exp Allergy*, 37, 572-81.
- Vanhoutte, T., G. Huys, E. Brandt & J. Swings (2004) Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol*, 48, 437-46.
- Verhasselt, V. (2010a) Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Curr Opin Immunol*, 22, 623-30.
- Verhasselt, V. (2010b) Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol*, 3, 326-33.

- Verhulst, S. L., C. Vael, C. Beunckens, V. Nelen, H. Goossens & K. Desager (2008) A longitudinal analysis on the association between antibiotic use, intestinal microflora, and wheezing during the first year of life. *J Asthma*, 45, 828-32.
- Vidron C., B. Lancelot, M. Sabourdy (1968) Développements technologiques en gnotobiologie. *Expér. anim.*, 1, 221-223.
- Vila, L., K. Beyer, K. M. Järvinen, P. Chatchatee, L. Bardina & H. A. Sampson (2001) Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*, 31, 1599-606.
- von Mutius, E. & D. Vercelli (2010) Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*, 10, 861-8.
- Vuillermin, P. J., A. L. Ponsonby, R. Saffery, M. L. Tang, J. A. Ellis, P. Sly & P. Holt (2009) Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naïve T-cells, and the risk of allergic disease. *Allergy*, 64, 348-53.
- Wal, J. M. (1998) Cow's milk allergens. *Allergy*, 53, 1013-22.
- Wal, J. M. (2002) Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89, 3-10.
- Wal, J. M., H. Bernard, C. Créminon, C. Hamberger, B. David & G. Peltre (1995) Cow's milk allergy: the humoral immune response to eight purified allergens. *Adv Exp Med Biol*, 371B, 879-81.
- Wallner, G., R. Amann & W. Beisker (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14, 136-43.
- Wang, T. N., W. Y. Chen, Y. F. Huang, N. H. Shih, W. W. Feng, H. I. Tseng, C. H. Lee & Y. C. Ko (2006) The synergistic effects of the IL-9 gene and environmental exposures on asthmatic Taiwanese families as determined by the transmission/disequilibrium test. *Int J Immunogenet*, 33, 105-10.
- Wannemuehler, M. J., H. Kiyono, J. L. Babb, S. M. Michalek & J. R. McGhee (1982) Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol*, 129, 959-65.
- Watanabe, S., Y. Narisawa, S. Arase, H. Okamatsu, T. Ikenaga, Y. Tajiri & M. Kumemura (2003) Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 587-91.
- Weiner, H. L. (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*, 3, 947-54.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman & W. J. Wiebe (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6578-83.



- Wills-Karp, M., J. Santeliz & C. L. Karp (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*, 1, 69-75.
- Wilson, A. D., M. Bailey, N. A. Williams & C. R. Stokes (1991) The in vitro production of cytokines by mucosal lymphocytes immunized by oral administration of keyhole limpet hemocyanin using cholera toxin as an adjuvant. *Eur J Immunol*, 21, 2333-9.
- Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura & S. Sakaguchi (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322, 271-5.
- Wingender, G., D. Stepniak, P. Krebs, L. Lin, S. McBride, B. Wei, J. Braun, S. K. Mazmanian & M. Kronenberg (2012) Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice. *Gastroenterology*.
- Woodmansey, E. J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*, 102, 1178-86.
- Wostmann, B. S. (1981) The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr*, 1, 257-79.
- Wu, K., Y. Bi, K. Sun & C. Wang (2007) IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol*, 4, 269-75.
- Xu, J. & J. I. Gordon (2003) Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10452-9.
- Yamaguchi, M., C. S. Lantz, H. C. Oettgen, I. M. Katona, T. Fleming, I. Miyajima, J. P. Kinet & S. J. Galli (1997) IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med*, 185, 663-72.
- Yamamoto, M., R. Yamaguchi, K. Munakata, K. Takashima, M. Nishiyama, K. Hioki, Y. Ohnishi, M. Nagasaki, S. Imoto, S. Miyano, A. Ishige & K. Watanabe (2012) A microarray analysis of gnotobiotic mice indicating that microbial exposure during the neonatal period plays an essential role in immune system development. *BMC Genomics*, 13, 335.
- Yamanaka, T., L. Helgeland, I. N. Farstad, H. Fukushima, T. Midtvedt & P. Brandtzaeg (2003) Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol*, 170, 816-22.
- Yao, T. C., C. J. Chang, Y. H. Hsu & J. L. Huang (2010) Probiotics for allergic diseases: realities and myths. *Pediatr Allergy Immunol*, 21, 900-19.
- Yokota, A., H. Kikutani, T. Tanaka, R. Sato, E. L. Barsumian, M. Suemura & T. Kishimoto (1988) Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell*, 55, 611-8.
- Yu, L. C. & M. H. Perdue (2001) Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev*, 179, 61-73.

- Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo & W. E. Paul (2006) GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16, 3-10.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans & W. M. De Vos (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3854-9.
- Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans, W. M. A.-v. Vliet, J. A. G. M. d. Visser & W. M. d. Vos (2001) The Host Genotype Affects The Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13, 129-134.
- Zoetendal, E. G., M. Rajilic-Stojanovic & W. M. de Vos (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57, 1605-15.
- Zoetendal, E. G., A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A. D. Akkermans & W. M. de Vos (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*, 68, 3401-7.
- Zuercher, A. W., S. Holvoet, M. Weiss & A. Mercenier (2010) Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clin Exp Allergy*, 40, 942-50.

# Liste des communications

---

## - Publications

- **S. Morin**, H. Bernard, L. Przybylski-Nicaise, G. Corthier, S. Rabot, J.M. Wal and S. Hazebrouck. “Allergenic and immunogenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice” *Mol Nutr. Food. Res.* 2011, 55, 1700-1707.

- **S. Morin**, R. Fischer, L. Przybylski-Nicaise, H. Bernard, G. Corthier, S. Rabot, J.M. Wal and S. Hazebrouck. “Delayed bacterial colonization of the gut alters the host immune response to oral sensitization against cow's milk proteins” *Mol Nutr. Food. Res.* 2012.

## - Communications écrites (poster)

- “Delayed bacterial colonization of the gut increases susceptibility of BALB/c mice to allergic sensitization” - **2<sup>nd</sup> symposium Microbes For Health, Paris, 1-2 Décembre 2011.**

- “Assessment of intrinsic allergenicity and immunogenicity of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and casein in germ-free BALB/c mice” - **30<sup>ème</sup> congrès annuel de L'EAACI (Académie Européenne d'Allergie et d'Immunologie Clinique), Istanbul (Turquie), 11-15 Juin 2011** (obtention d'une bourse des organisateurs).

- “Impact du microbiote intestinal sur le potentiel allergénique et immunogénique des caséines et de la  $\beta$ -lactoglobuline bovines chez la souris BALB/c” - **5<sup>ème</sup> Congrès Francophone d'Allergologie (CFA), Paris, 27-30 Avril 2010.**

## - Communications orales

- “Delayed bacterial colonization of the gut increases susceptibility of BALB/c mice to allergic sensitization” - **Workshop du réseau Cross Talk, Oslo, 12-13 Avril 2012.**

- “Impact of a delayed bacterial colonization of the gut on susceptibility to allergic sensitization to cow's milk in mice” - **30<sup>ème</sup> congrès annuel de L'EAACI, Istanbul, 11-15 Juin 2011.**