



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ACADEMIE DE NANCY- METZ
UNIVERSITE DE NANCY I

FACULTE DES SCIENCES

UFR : STB

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Fransiska RUNGKAT-ZAKARIA

SUJET

**ETUDE DE L'ALLERGENICITE DE LA CASEINE BOVINE:
REPOSE PROLIFERATIVE DES LYMPHOCYTES ET MASTOCYTES A
L'ALIMENTATION EN CASEINE ET MISE EN EVIDENCE DE
L'ABSORPTION INTESTINALE DES ANTIGENES CHEZ DES SOURIS**

Soutenu publiquement le 10 juin 1991 devant la Commission d'Examen

Composition du Jury :

President : G. LINDEN (Professeur à l'Université de Nancy I)

Rapporteurs :

J-M WAL (Directeur de Recherches INRA-CEA)

L. MEJEAN (Directeur de Recherches INSERM, Nancy)

M. DAUÇA (Professeur à l'Université de Nancy I)

Examineurs :

F. NABET-BELLEVILLE (Professeur à l'Université de Nancy I)

P. NABET (Professeur à l'Université de Nancy I)



A

mes enfants

ma mère

Teresa et Lukas

**who never bother to ask why
but all the time
faithful**

ABSTRACT

Feeding 100 mg/day of casein in mice resulted in in vitro lymphoblastic responses in the presence of the antigen and total IgG production in the plasma as well as in the culture supernatants. This sensitization was evaluated by lymphoblastic transformation test (LTT) where the presence of casein in the culture medium stimulated lymphocytes ^3H -thymidine incorporation. Casein ingestion at younger age (before 2 months) sensitized the mice more rapidly and intensively.

Lymphocytes sensitized by casein ingestion recognized in vitro not only casein but its digestive enzyme hydrolysed fragments, which signified that the hydrolysis processes by the three enzymes did not eliminate the antigenic determinant of casein.

Plasma and cultured lymphocyte total IgG productions were not accompanied by the production of specific IgG anti casein. In addition, there was no indication of IgE production in the fed mice, as was shown by the negative results of mastocyte histamine antigenic liberation test and cutaneous test. However, mastocyte histamine accumulation was observed in the fed mice. Since lymphocyte sensitization and mastocyte histamine accumulation caused by casein ingestion are important factors in allergic reactions, the results of this study should be considered in casein feeding practice.

The results of intestinal absorption experiments using mouse everted intestinal sacs revealed the passage of antigens issued from casein and its peptic (P) and peptic-tryptic-chymotryptic (PTC) hydrolysates. Further analysis by electrophoresis and autoradiography showed only the absorption of fragments derived from P hydrolysate, which had a molecular weight around 2500 Da. However, identification by ultrafiltration method showed the absorption of peptides issued from casein and its hydrolysates having the molecular weight inferior to 3000 Da. These absorbed fragments still contained the antigenic sites, as demonstrated by the results of the immunodotting and radioimmunodotting tests.

The antigenicity of casein and its hydrolysate HPLC fractions were determined by ELISA and immunodotting method using rabbit α , β , and κ casein antiserum. This capacity was found in all fractions tested except for those derived from PTC hydrolysate which did not form antigen-antibody complexes with κ -casein antiserum.

The results of this study establish casein sensitization steps which could be summarized as followed : Casein (antigen) consumption ---> Enzymatic hydrolysis in the digestive tract ---> Absorption of antigenic peptide (MW < 3000 Da) ---> lymphocyte sensitization ---> IgG production.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Appliquée de la Faculté des Sciences, dirigé par Messieurs Les Professeurs G. LINDEN et J.Y. Le DEAUT et au Laboratoire de Biochimie Médicale I de la Faculté de Médecine, dirigé par Monsieur le Professeur P. NABET et Madame le Professeur F. BELLEVILLE-NABET

Je voudrais exprimer ma très profonde gratitude à notre Université d'origine, l'Institut d'Agronomie de Bogor, Indonésie, pour m'avoir donné l'occasion de faire ces études en France, au Ministère des Affaires Etrangères de la France qui a fourni le financement de cette étude, à FORMAGRO qui a facilité l'orientation académique ainsi qu' au personnel du CROUS de Nancy qui a fidèlement géré la bourse mensuelle.

Je remercie Monsieur LINDEN qui a bien voulu en tout premier m'accueillir dans son laboratoire. Je le remercie de tout mon coeur pour ses précieux conseils dans la réalisation de ce travail ainsi que ses moyens de l'accomplir, sa gentillesse et la simplicité de ses contacts humains.

Je suis très reconnaissante à Monsieur NABET qui m'a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire et qui m'a initiée aux techniques d'étude biologique. Je lui exprime mes remerciements les plus sincère pour les judicieux conseils scientifiques qu'il m'a prodigués ainsi que pour les facilités qu'il m'a données pour permettre la réalisation de ma formation de chercheur.

Je suis très heureuse de pouvoir remercier Madame NABET qui s'est occupée scientifiquement et gentilement de mon travail. J'ai bénéficié de sa compétence et de son constant appui dans l'accomplissement d'un travail de recherche et dans la rédaction de ce manuscrit qui ont nécessité efforts et persévérance. Ses sincérités se sont exprimées dans tous les conseils et dans tout le temps donnés.

Je remercie les autres membres de la Commission d'Examen qui me font l'honneur d'accepter de juger cette thèse :

*Monsieur Jean-Michel WAL, Directeur de Recherches INRA-CEA
Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA Saclay, Gif sur
Yvette*

Monsieur Luc MEJEAN, Directeur de Recherches INSERM, Nancy

Monsieur M. DAUÇA, Professeur à l'Université de Nancy I

Mes remerciements vont également à Madame HATIER et à son équipe du Laboratoire de Histologie de Faculté de Médecine, pour leur collaboration dans la réalisation des techniques d'histologiques.

C'est avec plaisir que je remercie D. PAQUET de m'avoir donné ses conseils dans la première année de thèse, les Collaborateurs de l'Equipe de Protéines et de Peptides, J-M GIRARDET, A. DRIOU, M. LEPRINCE, tous les membres du Laboratoire de Biochimie Appliquée, ainsi que tous mes Collègues et les Membres du Laboratoire de Biochimie Médicale I, Madame CAPIOMONT, Madame HEULIN, Madame HESS pour leur aide amicale et efficace tout au long de cette étude.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
1.1. PRESENTATION DU TRAVAIL	1
1.2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.2.1. Généralités sur l'allergologie	3
1.2.1.1. Terminologie	3
1.2.1.2. Hypersensibilité immédiate	4
1.2.1.2.1. Mécanisme de la réaction d'hypersensibilité immédiate	4
1.2.1.2.2. Les cellules.....	5
1.2.1.2.3. Le système IgE	6
1.2.1.2.3.1. Contrôle génétique de la production d'IgE.....	8
1.2.1.2.3.2. Régulation de la production d'IgE par les lymphocytes.....	9
1.2.1.2.3.3. Fixation des IgE sur la mem- brane cellulaire	9
1.2.1.2.4. Les médiateurs.....	10
1.2.1.3. Phénomène d'ARTHUS.....	10
1.2.1.3.1. Mécanisme de la réaction inflammatoire	12
1.2.1.3.2. Activation par l'anticorps	12
1.2.1.3.3. Système du complément (C).....	13
1.2.1.4. Hypersensibilité retardée	13
1.2.1.4.1. Les mécanismes des réactions	13
1.2.1.4.2. Rôle des lymphokines dans les réactions d'hypersensibilité retardée	14
1.2.2. Les caséines du lait.....	16
1.2.2.1. Les protéines du lait bovin.....	16
1.2.2.2. Les valeurs nutritionnelles des caséines.....	17
1.2.2.3. Caractéristiques biologiques de la caséine.....	19
1.2.2.3.1. Effet sur l'absorption minérale et vitaminique	19
1.2.2.3.2. Autres activités biologiques	20
1.2.3. Biochimie d'allergènes alimentaires.....	21
1.2.3.1. Caractéristique de l'allergène	21
1.2.3.2. Méthode de détermination de l'allergénicité d'une molécule.....	22
1.2.4. Allergénicité du lait.....	24
1.2.4.1. Symptômes de l'allergie au lait.....	25
1.2.4.2. Tests de diagnostics immunologiques.....	26
1.2.4.2.1. Test de transformation lymphoblastique (TTL)	27
1.2.4.2.2. Test de libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM)	27
1.2.4.2.3. L'intérêt du dosage d'anticorps	28
1.2.4.3. Les allergènes du lait bovin.....	28
1.2.4.4. Effet du traitement physico-chimique.....	29
1.2.4.4.1. Traitement thermique.....	29

1.2.4.4.2. Traitement par hydrolyse.....	30
1.2.5. L'intestin, la porte d'entrée d'allergènes alimentaires.....	30
1.2.5.1. Modalités de l'absorption des protides, peptides et acides aminés	31
1.2.5.2. Présentation de l'allergène alimentaire	31
1.2.5.2.1. La barrière immunologique.....	32
1.2.5.2.2. Réponse par les lymphocytes à l'introduction de l'antigène.....	33
1.2.5.3. Perméabilité de la muqueuse dans l'allergie intestinale	35
1.2.5.4. Composant alimentaire favorisant la sensibilisation	35
II MATERIEL ET METHODES.....	36
2.1. PREPARATION DES PROTEINES ET DES HYDROLYSATS.....	36
2.1.1. Obtention des caséines entières	36
2.1.2. Extraction des caséines des aliments de souris	36
2.1.3. Préparation des hydrolysats enzymatiques de caséine.....	36
2.1.3.1. Les enzymes	36
2.1.3.2. Protocole d'hydrolyse	37
2.2. ANALYSES DES PROTEINES ET PEPTIDES	37
2.2.1. Dosage des protéines	37
2.2.2. Détermination de -NH ₂ libre.....	38
2.2.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE).....	38
2.2.3.1. Principe	38
2.2.3.2. Protocole.....	39
2.2.3.2.1. PAGE-Urée	39
2.2.3.2.2. PAGE-SDS	40
2.2.3.2.3. PAGE-SDS en gradient de gel	40
2.2.3.2.4. Focalisation Isoélectrique (FIE)	41
2.2.4. Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-phase inverse)	41
2.3. LES ANIMAUX	42
2.3.1. Alimentation et Immunisation.....	42
2.3.1.1. Alimentation des souris normales	42
2.3.1.2. Alimentation des souris "non contaminées".....	42
2.4. TEST D'ALLERGENICITE ET D'ANTIGENICITE.....	44
2.4.1. Préparation des suspensions cellulaires	44
2.4.1.1. Suspension mastocytaire	45
2.4.1.2. Suspension Lymphocytaire	46
2.4.2. Test de la libération antigénique d'histamine de mastocytes (TLAHM).....	46
2.4.2.1. Incubation des mastocytes.....	46
2.4.2.2. Dosage d'histamine.....	47
2.4.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL)	48
2.4.3.1. Milieu de culture.....	48
2.4.3.2. L'antigène	49
2.4.3.3. La phytohémagglutinine (PHA)	49

2.4.3.4. La culture.....	49
2.4.3.5. Expression du taux de stimulation	49
2.4.4. Le test cutané.....	50
2.4.5. Tests immuno-enzymatiques.....	51
2.4.5.1. ELISA.....	51
2.4.5.2. Immunodotting.....	52
2.4.5.3. Radioimmunodotting	52
2.5. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE.....	53
2.5.1. Marquage de la caséine en ¹⁴ C.....	53
2.5.2. Préparation des sacs intestinaux.....	53
2.5.3. Incubation.....	54
2.5.4. Histologie	55
2.5.5. Autoradiographie	56
2.5.6. Ultrafiltration.....	56
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	57
3.1. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE LYMPHOCYTES ET DES CONDITIONS D'INCUBATION DES MASTOCYTES	57
3.1.1. Effet de la dose de PHA	57
3.1.2. Cinétique des réponses à différentes concentrations de la caséine.....	58
3.1.3. Effet de la dose de caséine sur la libération d'histamine par les mastocytes	58
3.1.4. Discussion.....	60
3.1.4.1. La dose optimale de PHA.....	60
3.1.4.2. Le temps de culture optimal.....	60
3.1.4.3. La concentration optimale de caséine.....	61
3.1.4.4. La dose optimale de caséine dans le test de libération antigénique d'histamine des mastocytes (TLAHM)	61
3.2. TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE DES CELLULES DE SOURIS "NORMALES" RECEVANT 100 mg DE CASEINE PAR JOUR.....	63
3.2.1. Réponses à la PHA.....	66
3.2.2. Réponse aux caséines	68
3.2.3. Discussion.....	68
3.2.3.1. Stimulation par la PHA.....	68
3.2.3.2. La réponse de "souris contrôle"	69
3.2.3.3. Réponses des souris immunisées par voie intra- péritonéale	70
3.2.3.4. Effet de l'ingestion de la caséine.....	71
3.3. MISE EN EVIDENCE DES REACTIONS IGE-DEPENDANTES CHEZ DES SOURIS "NORMALES" ALIMENTEES EN CASEINE	72
3.3.1. Le taux total d'histamine.....	72
3.3.2. Test de libération antigénique d'histamine des mastocytes (TLAHM)	73
3.3.3. Le test cutané.....	74
3.3.4. Discussion.....	74

3.4. CARACTERISTIQUES DES HYDROLYSATS DES CASEINES.....	77
3.4.1. Courbes étalons de lysine, leucine et caséine	77
3.4.2. Hydrolyse de la caséine par la pepsine	77
3.4.3. Traitement de l'hydrolysate pepsique par trypsine- chymotrypsine	79
3.4.4. Discussion.....	79
3.4.4.1. La méthode d'OPA pour la détermination de groupements-NH ₂ libres	79
3.4.4.2. Taille théorique des molécules de peptides issus des hydrolyses	83
3.5. REPONSES PROLIFERATIVES DE LYMPHOCYTES ET TAUX D'HISTAMINE DE MASTOCYTES CHEZ DES SOURIS "NON CONTAMINEES"	88
3.5.1. Réponse proliférative en fonction du temps d'alimentation en caséine	89
3.5.2. Réponse proliférative en présence de caséine et de ses hydrolysats	97
3.5.3. Mesure des taux d'IgG totales dans le plasma de l'ensemble des souris et dans les surnageants de cultures de lymphocytes provenant de ces mêmes souris.	101
3.5.4. Mesure des taux d'IgG spécifiques anti-caséine dans les plasmas et surnageants de cultures de lymphocytes	103
3.5.5. Mesure du taux d'histamine des mastocytes	103
3.5.6. Discussion.....	107
3.5.6.1. Effet de l'alimentation en caséine sur la prolifération lymphoblastique	107
3.5.6.2. Pourcentage de souris qui sont sensibilisées par l'alimentation en caséine	108
3.5.6.3. Signification de la production d'IgG.....	109
3.5.6.4. Signification de l'activité proliférative des hydrolysats de caséine	109
3.6. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE.....	112
3.6.1. Mise en évidence de la viabilité des membranes intestinales.....	112
3.6.1.1. Cinétique d'absorption du ¹⁴ C-PEG-4000, de la ¹⁴ C-caséine et de son hydrolysate pepsique.....	112
3.6.1.2. Mesure des gradients de concentration des produits marqués dans les liquides absorbés dans les sacs intestinaux et dans le milieu d'incubation.	113
3.6.1.3. Examen histologique de la membrane intestinale.....	115
3.6.2. Absorption transépithéliale et mucoale des ¹⁴ C-caséines	119
3.6.2.1. Absorption transépithéliale	119
3.6.2.2. Absorption mucoale	119
3.6.3. Effet de la caséine sur la perméabilité intestinale	119
3.6.4. Identification des molécules absorbées.....	123

3.6.4.1. Electrophorèse et autoradiographie.....	123
3.6.4.2. Ultrafiltration.....	127
3.6.5. Discussion.....	127
3.6.5.1. Perméabilité et viabilité de la membrane intestinale.....	127
3.6.5.2. Absorption transépithéliale des ¹⁴ C-caséine (¹⁴ C-C), de ¹⁴ C-hydrolysats P (¹⁴ C-P) et ¹⁴ C-hydrolysats PTC (¹⁴ C-PTC).....	132
3.6.5.3. Effet des caséines sur la perméabilité de la muqueuse intestinale.....	133
3.6.5.4. Mécanisme d'absorption.....	134
3.6.5.5. Absorption mucosale des caséines et de leurs hydrolysats P et PTC.....	135
3.7. RECHERCHE DES FRAGMENTS ANTIGENIQUES ISSUS DES CASEINES.....	136
3.7.1. CLHP-phase inverse des caséines et de leurs hydrolysats.....	136
3.7.1.1. Séparation des caséines.....	136
3.7.1.2. Séparation d'hydrolysats pepsique.....	136
3.7.1.3. Séparation d'hydrolysats PTC.....	136
3.7.1.4. Choix des fractions CLHP des peptides pour la détermination de leur antigénicité.....	137
3.7.2. Antigénicité des fractions de CLHP phase inverse des hydrolysats P et PTC.....	140
3.7.2.1. Antigénicité des peptides dans les fractions d'hydrolysats P et PTC déterminée par méthode immunodotting.....	140
3.7.2.2. Test ELISA.....	142
3.7.3. Antigénicité des peptides filtrés par la membrane intestinale.....	142
3.7.3.1. Mise au point de la détection de complexe ¹⁴ C-caséine-immunsérums anti-caséines.....	145
3.7.3.2. Détermination des complexes antigène-anticorps formés entre les fragments filtrés par l'intestin et des immunsérums anti-caséine.....	146
3.7.3.3. Antigénicité des peptides déterminée par la méthode d'immunodotting.....	146
3.7.4. Discussion.....	149
3.7.4.1 Comparaison des résultats obtenus avec les méthodes d'immunodotting et d'ELISA.....	149
3.7.4.2 Caractéristiques chimiques des peptides antigéniques.....	149
3.7.4.3 L'antigénicité des peptides de faible poids moléculaire.....	150
IV. CONCLUSION.....	152
V. BIBLIOGRAPHIE.....	155
ANNEXES.....	184

ABREVIATIONS

Ac	anticorps
Ag	antigène
α s-CN	caséine alpha s
β -CN	caséine bêta
κ -CN	caséine kappa
C	caséine
CLHP	chromatographie liquide de haut performance
Da	Dalton
DO	densité optique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Ig	immunoglobuline
β -Lg	bêta lactoglobuline
α -La	alpha lactalbumine
P	hydrolysat pepsique
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyéthylène glycol
PHA	phytohémagglutinine
PM	poids moléculaire
PTC	hydrolysat pepsique-trypsique-chymotrypsique
SAB	serum albumine bovine
SDS	sodium dodécyl sulphate
TCA	acide trichloroacétique
TLAHM	test de la libération antigénique de l'histamine des mastocytes
TTL	test de transformation lymphoblastique
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine

N.B. Les abréviations des acides aminés sont celles de l'IUB (International Union of Biochemistry)

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

1.1. PRESENTATION DU TRAVAIL

Dans l'alimentation humaine, le lait de vache occupe une place privilégiée. Riche en protéines, lipides, glucides, sels minéraux et vitamines, il possède un double intérêt nutritionnel et économique.

Les statistiques de consommation du lait et des produits laitiers des années 1977 à 1987 ont été récemment publiées (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986). Parmi les 29 pays faisant partie de l'enquête, la consommation en France est respectivement de 78,1 kg de lait et de 55,63 kg d'autres produits laitiers pour l'année 1987 par habitant.

Le lait de vache remplace ou complète bien souvent le lait maternel chez le nourrisson ; néanmoins, étant riche en protéines et en glucides, il est également susceptible de provoquer des phénomènes d'intolérance tels que l'allergie et la maldigestion du lactose.

L'allergie au lait, comme toute allergie alimentaire est associée aux réactions immunitaires aboutissant à des désordres physiologiques. Elle est due la plupart du temps, à la conjonction de plusieurs facteurs :

- l'exposition à une substance laitière, un antigène T-dépendant particulier, appelé allergène
- des conditions particulières de stimulation allergénique dans lesquelles interviennent le temps d'exposition et la dose. L'ingestion représente une porte d'entrée favorable à l'établissement d'une sensibilisation
- une prédisposition génétique : les sujets qui souffrent de maladie atopique appartiennent généralement à des familles d'allergiques.

Ce travail a pour but d'étudier le mécanisme de la réponse allergique induite par les protéines du lait de vache, notamment la caséine, en utilisant les souris comme modèle. Quatre grands thèmes ont été abordés :

1. Réponse au niveau des lymphocytes et des mastocytes de souris "normales", (élevées chez le fournisseur), à une alimentation en caséine. L'ingestion de caséine peut-elle provoquer l'activation de lymphocytes et la sensibilisation de mastocytes *in vivo* ? C'est là une importante question à laquelle les tests de transformation lymphoblastique (TTL) et de libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM) tenteront de répondre.
2. La deuxième partie de ce travail est effectuée chez des souris "non-contaminées" (des souris de première génération élevées dans notre laboratoire qui n'ont jamais consommé de caséine bovine ni aucun autre produit dérivé du lait). Dans cette partie sont rapportées les expériences qui permettent d'étudier si les lymphocytes activés *in vivo* par l'ingestion de caséine peuvent reconnaître *in vitro* des hydrolysats de caséines obtenus par digestion par des enzymes protéolytiques d'origine digestive. Dans les cultures de lymphocytes, nous avons dosé la production d'IgG totales et d'IgG spécifiques anti-caséines.

3. Si l'ingestion de caséine a pu induire l'activation de lymphocytes *in vivo*, elle doit s'accompagner d'un passage au travers de la paroi intestinale de molécules antigéniques provenant de la caséine. Cette troisième partie est consacrée à la mise en évidence de l'absorption épithéliale des caséines marquées au ^{14}C et de leurs hydrolysats enzymatiques en utilisant des sacs intestinaux retournés de souris. Après absorption, nous avons essayé d'identifier les molécules qui traversent la paroi intestinale.
4. La dernière partie consiste en des études d'antigénicité des peptides de la caséine absorbés par l'intestin en comparaison avec celle des peptides séparés par CLHP. Pour rechercher les épitopes, nous avons utilisé des méthodes immunologiques.

1.2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique est limitée aux principes généraux de la réaction allergique aux protéines alimentaires, notamment aux protéines du lait.

1.2.1. Généralités sur l'allergologie

Les allergies peuvent se manifester par une simple tache d'eczéma sur la peau, des problèmes gastro-intestinaux et respiratoires et aller jusqu'à un choc anaphylactique mortel (LESSOF *et al.*, 1987; CANT, 1988). Le coût socio-économique de ces problèmes de santé est non négligeable. Il a été estimé en 1988 à 15 % des dépenses de santé de la population d'Amérique du Nord et d'Europe (CHANDRA *et al.*, 1989). Ce problème concerne 6 millions de personnes en France (DODET, 1989) et aux Etats-Unis, il entraîne une perte de 5 millions de journées de travail (VERCELLI et GEHA, 1989).

L'étude fondamentale de la réponse allergique est en effet celle de l'ensemble du système immunitaire. Les mécanismes qui représentent la physiopathologie des maladies allergiques ne peuvent être compris et analysés que s'ils sont éclairés par la connaissance des bases fondamentales de la régulation de la réponse immunitaire (BENVENISTE, 1986).

1.2.1.1. Terminologie

Tout constituant qui se montre capable de provoquer une réponse immunitaire à médiation cellulaire ou humorale est appelé immunogène. Cette propriété est appelée immunogénicité. La "tolérogénicité", ou aptitude à induire une incapacité de réponse d'une durée plus ou moins longue peut en être considérée comme un aspect particulier. L'antigénicité d'une substance est la capacité d'être reconnue par les récepteurs de certaines cellules lymphoïdes et éventuellement par le site anticorps de certaines molécules d'immunoglobulines. L'antigène est un constituant possédant ces deux capacités. Les allergènes sont des antigènes T-dépendants capables, chez certains individus prédisposés et dans certaines conditions particulières, d'induire la synthèse d'IgE. En effet, ce terme représente un mélange d'antigènes et d'allergènes. Mais grâce aux anticorps monoclonaux, il est possible d'obtenir des allergènes purifiés. Il semble que toute substance immunogène puisse, dans certaines circonstances, se comporter comme un allergène (TAYLOR *et al.*, 1987).

Le terme "allergie" est utilisé pour décrire, d'une part l'immunité protectrice et d'autre part l'hypersensibilité. PORTIER et RICHET ont observé le phénomène d'hypersensibilité en 1906 (BENVENISTE, 1986). La même année, PIRQUET l'a définie comme "la capacité pour un organisme, préalablement sensibilisé à une substance exogène, de réagir spécifiquement et d'une façon altérée lors de la réintroduction de cette substance (VERCELLI et GEHA, 1989). Par la suite, le terme allergie ou hypersensibilité est utilisé indifféremment pour définir toute réaction immunitaire aboutissant à des

désordres physiologiques. Cependant, ce terme est le plus souvent réservé à l'ensemble des maladies provoquées par l'activation des mécanismes d'hypersensibilité immédiate (BENVENISTE, 1986; DODET, 1989).

Il existe différents types de réactions immunitaires d'hypersensibilité qui peuvent entraîner divers états pathologiques. Ces réactions sont classées par GELL et COOMBS en quatre groupes (PAUPE, 1988a) :

- Le type I ou anaphylaxie, allergie humorale ou hypersensibilité immédiate. Ce type d'allergie donne une réaction immédiate en 10 à 15 minutes ou une heure suivant le test cutané.
- Le type II ou hypersensibilité cytotoxique, très rarement lié à l'allergie alimentaire.
- Le type III ou hypersensibilité à complexes immuns : concerne l'allergie alimentaire et comprend le syndrome d'ARTHUS. La réaction suivant le test cutané s'observe après quelques heures.
- Le type IV ou hypersensibilité retardée donne une réaction 8 à 48 heures après le test cutané.

1.2.1.2. Hypersensibilité immédiate

On peut définir l'hypersensibilité immédiate comme l'ensemble des réactions locales et générales qui résultent de la dégranulation des cellules spécialisées, basophiles et mastocytes, sensibilisées par des immunoglobulines E (IgE). Ces réactions comprennent la maladie atopique et le choc anaphylactique (ISHIZAKA 1971; CANT, 1988).

L'atopie est en fait un état caractérisé par une tendance héréditaire à produire des anticorps de type IgE dirigés contre des allergènes d'origine naturelle généralement de nature protéique. Elle est associée à la présence de symptômes tels qu'asthme, rhinite et eczéma. Il est prouvé que l'individu ayant un état atopique produit une réaction positive à l'allergène lors d'un test cutané. Le choc anaphylactique se manifeste par une rougeur et un oedème au point d'introduction des substances étrangères, par une sensation de malaise, un urticaire, un prurit, une impression de suffocation. Ces symptômes s'accompagnent d'une hypotension pouvant aller jusqu'au collapsus avec arrêt cardiaque (BENVENISTE, 1986; CANT, 1988; DODET, 1989).

1.2.1.2.1. Mécanisme de la réaction d'hypersensibilité immédiate

Des symptômes sont connus pour être causés par la libération de médiateurs préformés comme l'histamine, la sérotonine etc., par des basophiles ou des mastocytes du sang (ROIT *et al.*, 1985, WEST, 1986). Les mastocytes sont situés dans les tissus vascularisés au-dessous de l'épithélium, dans la lymphe ainsi que dans les cavités péritonéales (ROIT *et al.*, 1985, GALLI, 1987). Ces cellules peuvent libérer ces composés sous l'action de différents stimulants, comme l'antigène spécifique (si la cellule a été sensibilisée) (WEST, 1986; GALLI, 1987), les substances non immunologiques (ATKINSON *et al.*, 1979, CANDUSSIO *et al.*, 1987) et les agents phy-

siques (chaleur, froid, agents mécaniques etc.) (ATKINSON *et al.*, 1979, CANDUSSIO *et al.*, 1987, ALM 1983).

Au cours d'une stimulation immunologique ou non, les mastocytes peuvent non seulement déverser le contenu de leurs granules dans le milieu extérieur, mais aussi les médiateurs néo-formés dérivés de l'acide arachidonique, par action de la cyclooxygénase ou de la lipoxygénase (BENVENISTE, 1986).

L'IgE est un anticorps qui a la capacité de se fixer à la surface des mastocytes et des basophiles (ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1984). Cependant quelques auteurs ont montré la même capacité pour les IgG₄ (MODDLEY et MONGAR, 1981). Ils ont montré que seul le fragment Fc se lie sur les récepteurs spécifiques de ces cellules. Cette fixation a lieu lors d'un premier contact avec l'allergène, et elle conduit à l'état sensibilisé de ces cellules. Lors d'un deuxième contact avec l'allergène, celui-ci va réagir avec le fragment Fab des IgE fixées, réaliser un pontage entre deux IgE et provoquer la dégranulation du basophile ou du mastocyte. La présence de deux ou plusieurs molécules d'IgE pour une molécule d'antigène est nécessaire pour réaliser le pont entre les IgE sur la surface de la cellule en altérant la membrane et en provoquant l'entrée des ions calcium. L'induction de la synthèse d'IgE et la réaction allergique sont résumées par la figure 1. La dégranulation de ces cellules qui libèrent les substances responsables de manifestations allergiques est montrée sur la figure 2.

1.2.1.2.2. Les cellules

Le test de libération de l'histamine pour diagnostiquer les sujets allergiques est effectué surtout avec les cellules basophiles du sang (BENVENISTE *et al.*, 1977; HARRABI *et al.*, 1987;) alors que chez des animaux on utilise plutôt des mastocytes (SWIETER *et al.*, 1987; GALLI *et al.*, 1984).

Ces deux types de cellules ont été décrites par Paul EHRLICH à la fin du siècle dernier (GALLI, 1987) . Elles sont parfois confondues du fait de leur capacité de fixation des colorants métachromatiques. Les basophiles proviennent de la moelle osseuse. Ce sont des polynucléaires présents à l'état normal dans le sang circulant. Les mastocytes possèdent un noyau massif et leur cytoplasme est chargé de granules qui rendent difficiles les observations morphologiques en microscopie optique (DENBURG *et al.*, 1986).

Le sang de la souris et du rat sont très riches en mastocytes mais par contre ne possèdent pas de basophiles détectables. L'homme, le lapin, le cobaye, la tortue possèdent à la fois des mastocytes et des basophiles circulants. Les variations des basophiles et des mastocytes selon les espèces sont indiquées dans le tableau 1.

D'autres types de cellules interviennent dans la réaction allergique. Ce sont les cellules inflammatoires : éosinophiles, neutrophiles, monocytes/macrophages et plaquettes (DODET, 1989; DROUET, 1990).

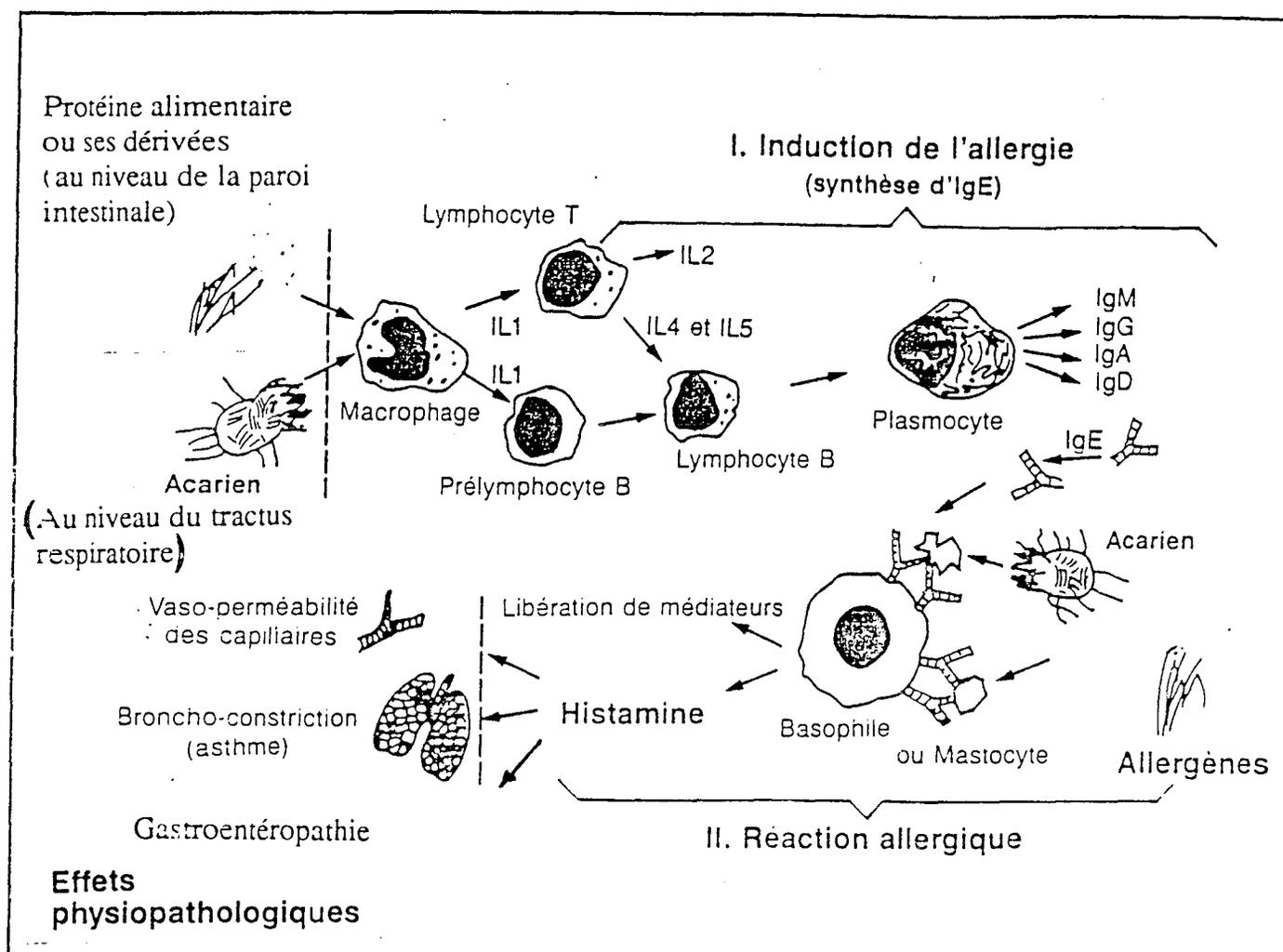


Figure 1. Schéma de la réaction allergique (DODET, 1989).

Schéma montrant la présentation de l'antigène par le macrophage et la production d'IL1 qui stimule le lymphocyte préconditionné pour reconnaître l'antigène. Cette stimulation entraîne l'expression par le lymphocyte T d'un récepteur pour l'IL2 et la production d'IL4 et IL5. Ce processus conduit à la production des immunoglobulines dont l'IgE et l'activation des cellules cibles.

1.2.1.2.3. Le système IgE

Grâce aux études d'ISHIZAKA (1966) et à la découverte concomitante de JOHANSSON et BENNICHI (1967), les caractéristiques biologiques, immunologiques et physicochimiques des IgE ont été définies. Cette dernière classe d'immunoglobulines est décrite par l'OMS en 1968 (RICCI *et al.*, 1986).

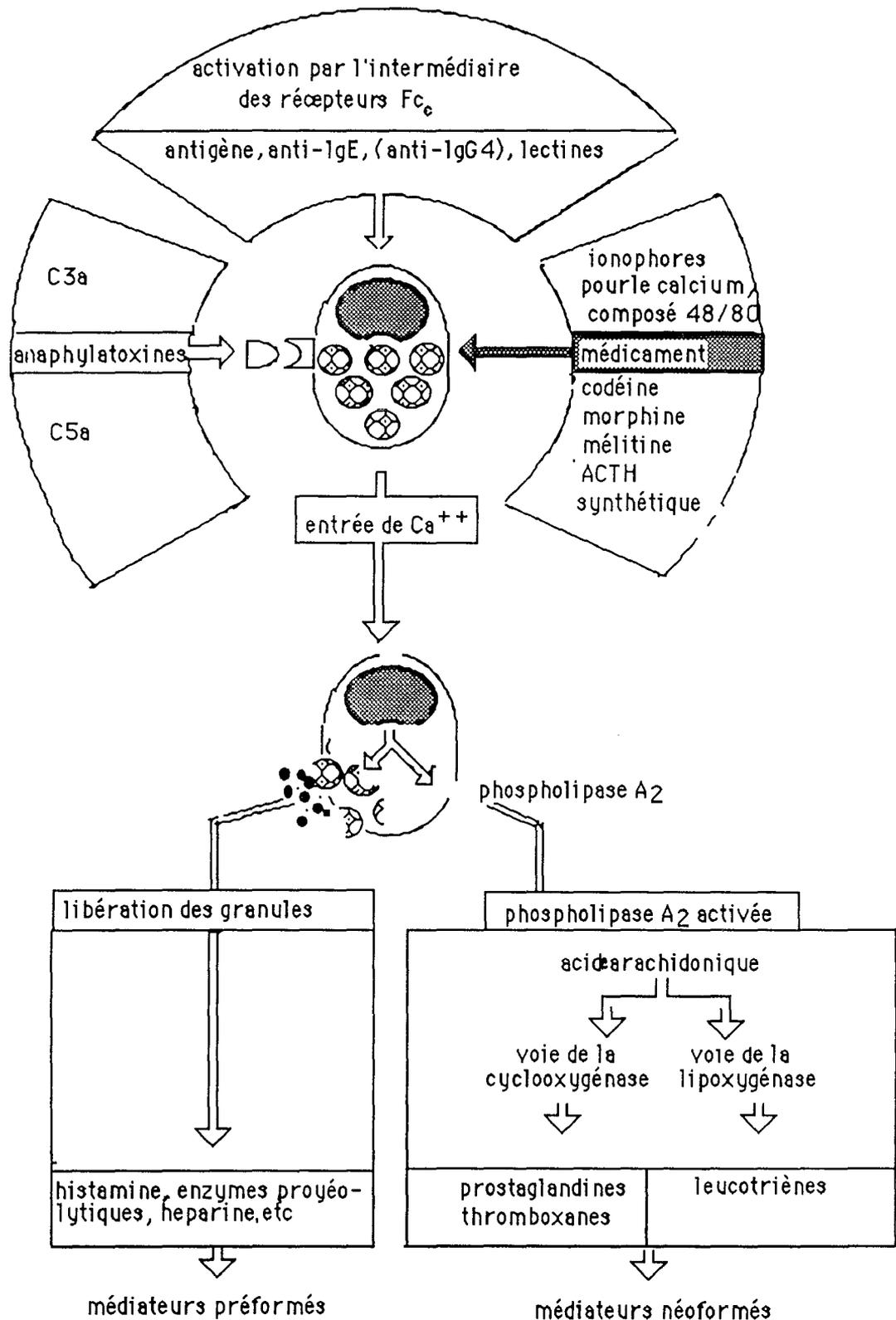


Figure 2. Activation et dégranulation de mastocyte.

En dehors des ligands immunologiques qui pontent les IgE fixées, d'autres stimulus non immunologiques sont capables d'activer les mastocytes. Tous ces produits ont une propriété commune à induire l'entrée des Ca⁺⁺, ce qui déclenche la dégranulation et la libération des médiateurs.

TABLEAU 1. REPARTITION DES MASTOCYTES ET DES BASOPHILES CHEZ LES VERTEBRES

ESPECES	BASOPHILES (p.100 Leucocytes)	MASTOCYTES
Homme	0,35-0,45	Nombreux
Singe	0,3	Nombreux
Lapin	4-11	Rares
Cobaye	1-3	Nombreux
Porc	2	Très nombreux
Chien	Très peu nombreux	Nombreux surtout dans le foie
Chat	Très peu nombreux	Très nombreux surtout dans les ganglions lymphatiques
Rat, souris	Très rares	Très nombreux dans la cavité péritonéale; 3 à 12 p. 100 leuc
Volaille	1-3,6	Très nombreux
Oiseau	17-23	Rares

En général, l'IgE joue un rôle important dans la défense de la muqueuse des voies respiratoires et de l'appareil gastro-intestinal contre des infections parasitaires. Lors des infections parasitaires intestinales, la réaction anaphylactique locale facilite l'expulsion du parasite (JARRET et MILLER, 1982; ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1984; CAPRON et DESSAINT, 1990).

L'inhalation ou l'ingestion d'un allergène entraîne la production d'anticorps IgE particulièrement chez un sujet présentant un terrain allergique. Les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire IgE sont actuellement à peu près bien établis. Les expériences conduites chez la souris et chez le rat ont démontré que la réponse est globalement influencée par des facteurs génétiques, par la nature et la dose de l'antigène, ainsi que par l'adjuvant utilisé (ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1984; RICCI *et al.*, 1986).

1.2.1.2.3.1. Contrôle génétique de la production d'IgE

Les gènes qui contrôlent la réponse IgE chez la souris sont présents sur le locus Ir-1 du locus H-2. Il semble que ce contrôle génétique se fasse par l'intermédiaire des cellules T-helper (BENACERRAF et Mc DEVITT, 1972; ISHIZAKA, 1985). D'autres gènes non liés au locus H-2 semblent contrôler les variations de la production des IgE totales ou non spécifiques (LEVINE et VAZ, 1970; ISHIZAKA, 1985).

Des études chez l'homme ont montré que les haplotypes HLA-A₂ ou HLB-B₈ étaient liés à une plus grande sensibilité à l'allergène Ra₃ du ragweed et Rye₁ du ryegrass (MARSH *et al.*, 1977). Il existe aussi chez l'homme le contrôle des IgE sériques totales et la possibilité de développer des allergies (ISHIZAKA, 1985).

La production globale des IgE spécifiques est sous le contrôle de gènes transmis selon le mode Mendélien, qui déterminent les individus bons ou mauvais producteurs d'IgE. La production des IgE spécifiques est sous le contrôle de gènes du complexe majeur de l'histocompatibilité (système HLA). Les sujets qui possèdent l'haplotype HLA-DW₂ synthétisent plus d'IgE spécifiques que ceux qui appartiennent à d'autres groupes (LEVINE et VAZ, 1970; HOPKIN, 1989).

1.2.1.2.3.2. Régulation de la production d'IgE par les lymphocytes

Les travaux d'équipe de l'ISHIZAKA (UEDE et ISHIZAKA, 1982; HUFF et ISHIZAKA, 1984) et de DELESPESE *et al.*, (1989) ont montré que des facteurs synthétisés par les lymphocytes T possèdent une grande affinité pour les IgE (IgE - Binding Factors ou IgE-BF). Ces facteurs modulent sélectivement la réponse en l'amplifiant ou en la diminuant. Il existe des IgE-BF produits par les lymphocytes T CD4⁺ ; des IgE-BF/s CD23 sécrétés par certains lymphocytes B qui correspondent à une forme clivée et soluble des récepteurs Fc-ε- RII (récepteurs de l'IgE de faible affinité). Les IgE-BF/s CD23 stimulent la croissance des lymphocytes B sécrétants d'IgE en présence d'interleukine 4.

Des études chez des rats nouveaux-nés thymectomisés montrent que les animaux n'ont pas la capacité de produire les anticorps IgE (OKOMURA et TADA, 1971). Les surnageants provenant de lymphocytes T non-stimulés de patients ayant une dermatite atopique sévère (syndrome avec hypersécrétion d'IgE) contiennent des facteurs "helper" solubles qui induisent la synthèse d'IgE (mais pas d'IgG) par les populations de cellules B normales (SARYAN *et al.*, 1983). Assez récemment, il a été rapporté que l'IL-4, lymphokine dérivée de cellules T, induit la production d'IgE *in vitro* par les cellules B de souris en présence de lipopolysaccharides (LPS) (COFFMAN *et al.*, 1986). Dans une observation *in vivo*, il est montré que l'administration d'anticorps de l'IL-4 inhibe la réponse IgE (FINKELMANN *et al.*, 1986). VERCELLI et GEHA (1989) ont dit que la synthèse d'IgE résulte de l'interaction complexe de cellules T et B et de monocytes sous contrôle de lymphokines (IL-4, IL-5, IL-6) dérivées de cellules T et de monocytes.

1.2.1.2.3.3. Fixation des IgE sur la membrane cellulaire

Les IgE sont fixées sur la membrane mastocytaire par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de haute affinité (Fc-ε-RI). Sur un mastocyte il existe $3 \cdot 10^5$ récepteurs et $4 \cdot 10^4$ sur un basophile. L'IgE a une très haute affinité pour ces récepteurs avec une constante d'association de l'ordre de $1 \text{ à } 9 \times 10^9/\text{M}$, ce qui explique qu'une très faible quantité d'anticorps soit capable de sensibiliser de façon prolongée les cellules cibles (METZGER *et al.*, 1982; SHIZAKA, 1985).

Un autre type de récepteur IgE (Fc-ε-RII) est présent sur les cellules inflammatoires : macrophages, éosinophiles et plaquettes. La fixation d'IgE

sur le Fc- ϵ -RII de ces cellules active les fonctions de celles-ci : libération de leucotriènes par les monocytes, de substances anti-parasites IgE-dépendantes par les éosinophiles et agrégations par les plaquettes (LEWIS, 1989).

1.2.1.2.4. Les médiateurs

Les médiateurs sont des substances libérées par les cellules et qui participent aux réactions allergiques. A ce jour, plus d'une cinquantaine ont été décrits (DODET, 1989). La figure 3 résume les différents types d'activité des médiateurs IgE-dépendant. L'histamine est le médiateur préformé sécrété par les basophiles et les mastocytes le plus anciennement connu, mais c'est aussi celui qui joue le rôle le plus important. Son action s'effectue à travers deux types de récepteurs : H₁ et H₂ (GESPACH *et al.*, 1987; RUFF et SANTAIS, 1988).

Sa fixation sur les récepteurs H₁ entraîne les manifestations de l'hypersensibilité immédiate : contraction des muscles lisses, vasodilatation. Sa fixation sur les récepteurs H₂ augmente les sécrétions gastriques et bronchiques (GESPACH *et al.*, 1987).

Les médiateurs néo-formés sont synthétisés au moment de la stimulation. Ce sont des lipides membranaires, métabolites de l'acide arachidonique. Celui-ci est métabolisé selon deux voies primaires :

- la cyclooxygénase dont les produits dérivés sont les prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGF₂), les thromboxanes A₂ et les prostacyclines (PGI₂) (LEWIS *et al.*, 1982; BENYON *et al.*, 1987).

- la lipoxygénase convertit l'acide arachidonique en produits possédant des actions biologiques puissantes : d'une part le leucotriène B₄ (LTB₄) et d'autre part les leucotriènes C₄, D₄, E₄ (LTL₄, LTD₄, LTE) (HOLGATE *et al.*, 1984; HOLGATE et FINNERTY, 1988). Ces médiateurs étaient connus autrefois sous le nom de Slow Reacting Substance A (SRS-A) (HOLGATE et FINNERTY, 1988).

Les leucotriènes C₄ et D₄ possèdent de puissants effets : bronchoconstriction, vasodilatation, chimiotaxie. Ils induisent la contraction musculaire (BECKER, 1989; LEE et ARM, 1989) alors que les prostaglandines provoquent des effets vasodilatateurs et bronchoconstricteurs (HOLGATE *et al.*, 1989).

1.2.1.3. Phénomène d'ARTHUS

Cette forme d'hypersensibilité constitue une interaction d'antigènes avec des anticorps humoraux et elle est classée dans le type III de la classification de COOMBS et GELLS parmi les réactions d'hypersensibilité immédiate. Elle porte le nom de l'auteur qui l'a décrite il y a 75 ans (PROUVOST-DANON, 1986).

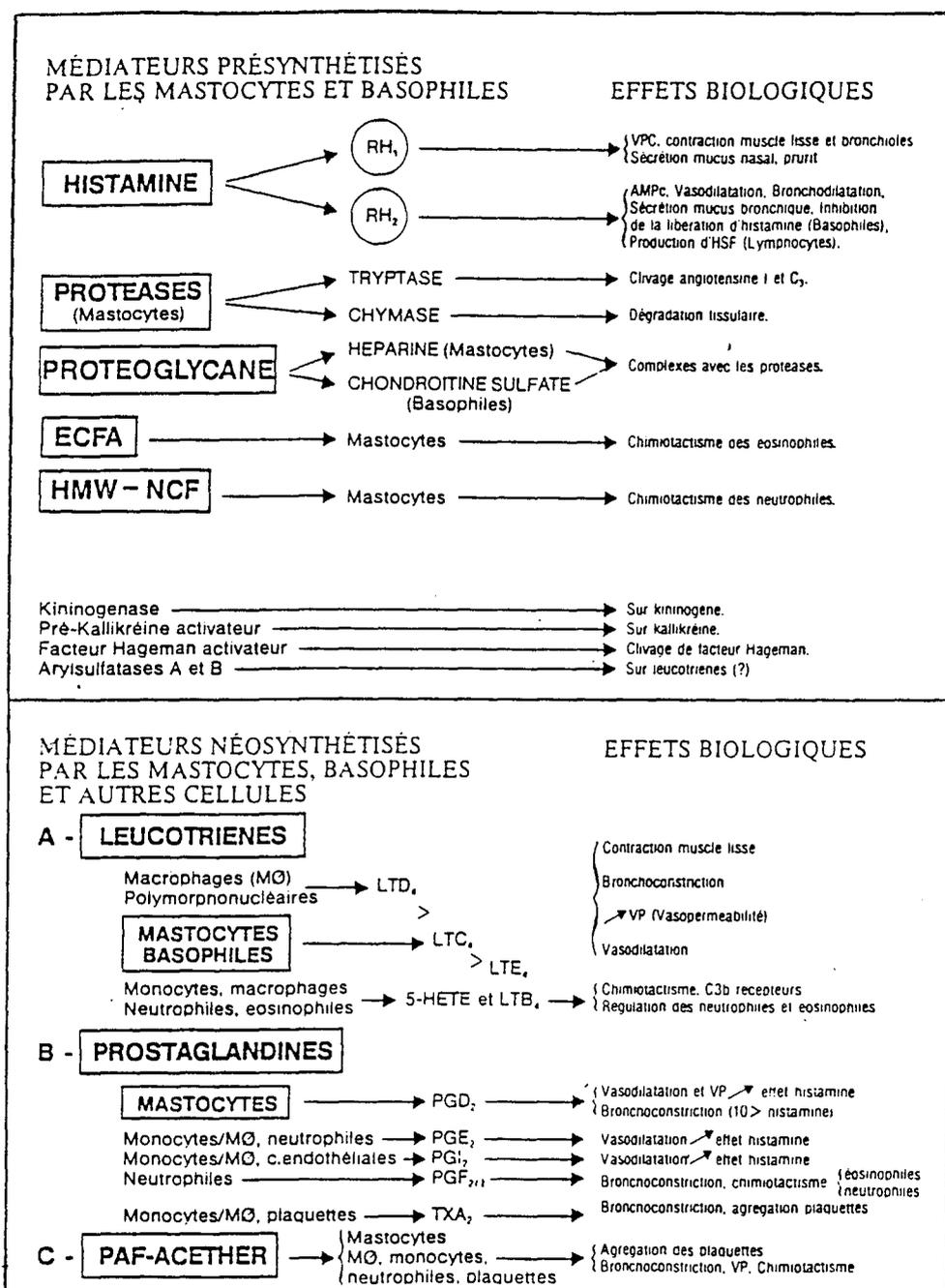


Figure 3. Médiateurs impliqués dans l'hypersensibilité à IgE (DODET, 1989)

ECFA: Eosinophil chemotactic factors of anaphylaxis

HMW-NCF: High molecular weight-neutrophil chemotactic factor

HETE: 5-hydroxyeicosatetraenoic

PG: Prostaglandin

TXA: Thromboxane

PAF: Platelet activating factor

Ce phénomène comprend la formation de complexes antigène-anticorps en excès d'anticorps. Ces complexes sont rapidement précipités et ils tendent à se localiser au site d'injection. Des complexes solubles peuvent se former s'il existe un excès d'antigènes et peuvent causer des réactions systémiques (maladies du sérum). Dans le cas d'allergie, des complexes immuns se forment avec des antigènes externes, par exemple dans les poumons après inhalation répétée d'antigènes végétaux fongiques ou animaux (ROIT *et al.*, 1985).

1.2.1.3.1. Mécanisme de la réaction inflammatoire

Après la formation de complexes antigène-anticorps une quantité de précipités s'accumule dans la paroi des petits vaisseaux cutanés. Ceci entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire qui cause l'oedème de ces parois et des cellules endothéliales (ce phénomène se passe dans les 30 premières minutes). Par la suite, les plaquettes viennent adhérer et en se détruisant libèrent de la thromboplastine qui transforme le fibrinogène en fibrine qui, à son tour, se dépose sur la paroi des vaisseaux. La formation de ces thrombi entraîne l'obstruction des vaisseaux et les premiers foyers hémorragiques apparaissent 1 à 2 h après l'introduction de l'antigène. Ces réactions atteignent leur maximum dans les 6 à 10 h suivantes. Dans le même temps, les leucocytes et surtout les polynucléaires neutrophiles s'accumulent autour des thrombi et infiltrent abondamment les tissus environnants. En effet, ces réactions ne sont pas une manifestation rapide comme l'hypersensibilité immédiate, c'est pourquoi elles sont parfois définies comme réactions d'hypersensibilité semi-retardée (ROIT *et al.*, 1985; PROUVOST-DANON, 1986).

1.2.1.3.2. Activation par l'anticorps

Les anticorps qui interviennent dans le phénomène d'ARTHUS sont des anticorps circulant de classe IgG₂, non fixés sur les mastocytes (comme le sont les anticorps IgE). Ils doivent fixer le complément (C) et l'activer pour être capable de produire le phénomène (BIELORY *et al.*, 1990). Cette fixation active la séquence complémentaire du complément en particulier du complexe C 5-6-7 et des sous-fragments C3a et C5a. Ces deux derniers sont des anaphylatoxines qui peuvent causer la libération de l'histamine des mastocytes et des basophiles et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (LESAURE, 1986). De plus, le C5a possède une activité chimotactique qui provoque l'accumulation des polynucléaires (SHOWELL *et al.*, 1982). Ces derniers libèrent des enzymes protéolytiques lysosomiales, en particulier des protéases acides et neutres (cathepsine, élastase, collagénase et thromboplastines) qui contribuent à endommager les parois vasculaires. Les polynucléaires libèrent par ailleurs des protéines cationiques qui ont des propriétés vasoactives et du pyrogène endogène qui entraîne une augmentation de température (SHOWELL *et al.*, 1982; LESAURE, 1986).

De plus, les IgG₁ sont amenées à jouer un rôle important dans le phénomène d'ARTHUS : elles semblent faciliter l'accumulation d'IgG₂ sur le lieu de la réaction (ROIT *et al.*, 1985; PROUVOST-DANON, 1986).

1.2.1.3.3. Système du complément (C)

Le complément est composé d'au moins 20 protéines présentes dans le plasma. Leur activation entraîne la formation en cascade de nombreux produits actifs. Le complément est en effet un système humoral majeur de défense contre les agressions étrangères (ROIT *et al.*, 1985; BIELORY *et al.*, 1990).

L'activation classique du complément est effectuée par les complexes antigène-anticorps. Les IgG₁, IgG₂ et IgM y jouent un rôle important (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1967; ROIT *et al.*, 1985; PROUVOST-DANON, 1986). Cette activation provoque la formation de la C3 et la C5 convertase. La libération de C3a et C5a entraîne une réaction inflammatoire (JOHNSON *et al.*, 1975). Le complexe lytique C5b-9 lyse différents types cellulaires tels que les globules rouges (HALPERIN *et al.*, 1988; WELLER-NICHOLSON et HALPERIN, 1989), les plaquettes (BECKER, 1978) les leucocytes (HAEFFNER-CAVAILLON *et al.*, 1987), les bactéries et les virus avec enveloppe lipoprotéique (BIELORY *et al.*, 1990).

L'attachement de C3a aux mastocytes a été rapporté par GERVASONI *et al.*, (1986,) et GERVASONI et RUDDY (1989), qui ont montré que de très nombreuses molécules de ¹²⁵I-C3a sont initialement attachées aux mastocytes péritonéaux de rats (10⁶ molécules/cellule). Mais ce nombre diminue de moitié dans les 20 premières secondes et encore de moitié dans les 10 min suivantes. Cette perte est due à la protéolyse de ¹²⁵I-C3a par la chymase qui se trouve sur la membrane des cellules. Après inhibition de l'activité enzymatique de la chymase, les mêmes auteurs ont réussi à déterminer 3 composants de la membrane où le ¹²⁵I-C3a s'attache (GERVASONI et RUDDY, 1989). Ce type de travail montre l'intervention du complément dans une réaction allergique.

1.2.1.4. Hypersensibilité retardée

Certains auteurs préfèrent utiliser le terme "à début retardé" (delayed onset hypersensitivity). Dans ce type d'allergie les réactions se manifestent au point d'injection 6 à 12 heures après l'administration de l'antigène. Elles atteignent leur maximum après 24 à 48 heures. Ces réactions sont caractérisées histopathologiquement par une infiltration lymphocytaire qui est transférable par les lymphocytes sensibilisés mais pas par le sérum. Ce sont des réactions dépendantes des lymphocytes T sensibilisés et dues à des médiateurs inflammatoires, les lymphokines, produits par ces lymphocytes (WECK, 1986; FREW et KAY, 1990). Les différents types d'hypersensibilité retardée sont résumés dans le tableau 2.

1.2.1.4.1. Les mécanismes des réactions

La première étape des réactions allergiques de type hypersensibilité retardée commence par une phase de sensibilisation qui comprend le première contact de l'antigène et des lymphocytes. La deuxième étape est une phase de développement comprenant la prolifération de lymphocytes spécifiquement sensibilisés. La troisième étape est une phase

effectrice où la deuxième rencontre des lymphocytes sensibilisés avec l'antigène entraîne la libération par les lymphocytes, des lymphokines, les médiateurs de l'inflammation (WECK, 1986; FREW et KAY, 1990).

Le tableau 3 résume les réactions d'allergie de type hypersensibilité retardée et la liste des médiateurs connus. Il existe également d'autres mécanismes faisant intervenir des anticorps qui peuvent être, soit associés à certaines cellules effectrices telles que les basophiles ou les macrophages, soit dirigés contre des cellules cibles (WECK, 1986; CONVERT et PAUPE 1988; FREW et KAY, 1990).

La phase effectrice en effet se déroule en deux stades. Lors d'un premier stade, les lymphocytes sensibilisés rencontrent l'antigène spécifique dans les vaisseaux sanguins puis par la suite migrent vers les tissus par la circulation sanguine. Cette rencontre stimule les lymphokines qui à leur tour entraînent la perméabilité cellulaire.

Cette dernière permet une augmentation de l'influx cellulaire dans le tissu ainsi que l'extraction de liquide et de certaines protéines sanguines (CONVERT et PAUPE, 1988). Il est rapporté que c'est la fibrine qui semble être responsable de l'induration dans les lésions d'hypersensibilité retardée (WECK, 1986; FREW et KAY, 1988; CONVERT et PAUPE 1988). Le deuxième stade est une réaction non spécifique. On observe dans le tissu concerné un afflux de divers types de cellules tels que les monocytes, les petits lymphocytes, les basophiles et les éosinophiles (FREW et KAY, 1988; ZWEIMAN, 1988).

1.2.1.4.2. Rôle des lymphokines dans les réactions d'hypersensibilité retardée

Le rôle des lymphokines dans les réactions d'hypersensibilité retardée a été confirmé par des expériences telles que :

- la disparition des macrophages péritonéaux par un facteur d'inhibition de la migration : le MIF qui agit sur les cellules *in vitro* (RALFKIAER et WANTZIN, 1984)
- la production de lésions inflammatoires par injection de surnageants de culture de lymphocytes sensibilisés et activés (GIRARD *et al.*, 1983; CONVERT et PAUPE 1988).
- l'administration d'anticorps antilymphokines qui entraînent la suppression des réactions d'hypersensibilité retardée (WECK, 1986).

En effet, les lymphokines jouent également un rôle important dans la réaction d'allergie de type immédiate. Cette observation a été confirmée par MORITA *et al.*, (1987). Ils démontrent que l'interleukine 2 (IL2) produite par les lymphocytes T activés augmente la libération d'histamine, induit par l'anti-IgE, à partir des polynucléaires basophiles humains. L'étroite relation entre hypersensibilité retardée et immédiate a été récemment résumée par FREW et KAY (1990).

TABLEAU 2. DIFFERENTS TYPES DE REACTION D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE

Type de réaction	Mode de sensibilisation	Agent effecteur	Caractéristiques de la réaction
Anticorps - dépendante, associée aux basophiles*	Doses moyennes de protéines ou conjugués haptène-protéines (100 µg) en adjuvant incomplet de Freund ou solution physiologique	IgG (cobaye)	Accumulation de basophiles dans les lésions à 24 heures Transférable par le sérum
Anticorps - dépendante, associée aux macrophages	Eczématogènes de contact, érythrocytes de mouton	IgG2 (cobaye, souris) cytophiliques pour macrophages	Infiltrat lymphomononucléaire très similaire à la réaction tuberculinique Transférable par macrophages sensibilisés ou sérum Maximum à 12-24 heures
Hypersensibilité de type Jones-Mote (type IV transitoire)	Faibles doses (0.1 - 3µg) d'antigène ou de complexes antigène-anticorps en adjuvant incomplet de Freund ou solution physiologique	Lymphocytes T sensibilisés	Pas d'anticorps détectables Hypersensibilité transitoire (2-10 jours) Lésion maximum à 24 heures, disparue à 48 heures Infiltrat de basophiles fréquent*
Type tuberculinique (type IV permanent)	Antigènes particuliers eczématogènes de contact Doses moyennes de protéines (10 - 100 µg) en adjuvant complet de Freund	Lymphocytes T sensibilisés	Hypersensibilité persistante (> 4 semaines) Lésion maximum à 24-30 heures, encore importante après 48-72 heures

TABLEAU 3. LYMPHOKINES ET MONOKINES PARTICIPANT PROBABLEMENT AUX REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE RETARDEE.

Médiateur (dénominations anglaises)	Poids moléculaire estimé	Nature	Effet in vitro
LYMPHOKINES			
1 Affectant les vaisseaux cutanés			
Vascular permeability factor (VPF)			
Permeability increasing factor (PIF)	12 500	Protéine	Augmente la perméabilité capillaire in vitro
Skin reactive factor (SRF)			
Antigen-specific factor (IgE-like)	70 000	Protéine	Entraine la libération de sérotonine par les mastocytes de souris
Macrophage activating factor (MAF)	25 000	Glycoprotéine	Augmente la cytotoxicité des macrophages
2 Affectant le chimiotactisme			
Neutrophil chemotactic factor (NCF)	700 000	Protéine	Attraction dirigée des neutrophiles
Macrophage chemotactic factor (MCF)	45 000, 18 000, 8 000	Glycoprotéines	Attraction dirigée des macrophages, monocytes
Lymphocyte chemotactic factors (LCF)	300 000, 160 000, 14 000, 5 000	Protéine	Attraction dirigée des lymphocytes
Eosinophil chemotactic factor (ECF)	< 1 000	Leukotriène B4?	Attraction dirigée des éosinophiles
Basophil chemotactic factor (BCF)	14 000	Protéine	Attraction dirigée des basophiles
3 Affectant la prolifération cellulaire			
Interleukine 2	15 000 - 19 000	Glycoprotéine	Favorise la prolifération des lymphocytes T
Lymphotoxines	25 000 et divers	Protéines	Toxique pour fibroblastes en culture
4 Affectant la migration cellulaire			
Leukocyte migration inhibition factor (LIF)	68 000	Protéine	Inhibition de la migration des granulocytes
Neutrophil migration inhibition factor (MIF)	35 000/25 000	Glycoprotéine (p 13 et 5)	Inhibition de la migration des granulocytes
Macrophage procoagulant inducing factor (MPIF)	35 000	Glycoprotéine	Induit le macrophage à produire des substances procoagulantes
Fibronectin (macrophage aggregation factor)	variable		Inhibe la migration et favorise l'agrégation des macrophages
MONOKINES			
Interleukine 1	15 000	Glycoprotéine	Augmente la réactivité lymphocytaire
Vasoactive fibrinopeptide	divers	Peptides dérivés de fibrinolyse	Augmente la perméabilité capillaire in vitro
Enzymes d'origine macrophagique	divers	Phosphatase acide, glucuro-	Activités enzymatiques diverses

Il existe deux tests *in vitro* qui permettent d'évaluer la réactivité des cellules T vis-à-vis de l'antigène. Un des tests consiste à mesurer la production des lymphokines à l'aide du test d'inhibition de la migration des macrophages. En présence de l'antigène, les lymphocytes sensibilisés produisent une lymphokine (MIF) qui inhibe la migration normale des macrophages. Un autre test est celui de la transformation lymphoblastique (TTL) qui sera expliqué ultérieurement. Ce test est utile dans le diagnostic de l'hypersensibilité retardée car il teste la mémoire des cellules T pour un antigène, mais sans préjuger de l'immunité protectrice de l'hôte, c'est-à-dire, de l'efficacité de la réaction immunitaire contre un micro-organisme invasif (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988).

1.2.2. Les caséines du lait

Les protéines du lait de vache ont attiré l'attention de nombreux chercheurs depuis 150 ans. Elles sont maintenant les protéines dont la physico-chimie et la biochimie sont les mieux connues parmi les protéines alimentaires (RIBADEAU-DUMAS, 1987). Ces caractéristiques physicochimiques sont en effet les bases des études biologiques de ces protéines telles que les valeurs nutritionnelles, les activités physiologiques et les capacités allergéniques. Mais essayons dans cette partie de rappeler quelques généralités sur ces protéines et de résumer les données publiées à ce jour.

1.2.2.1. Les protéines du lait bovin

Les protéines du lait bovin peuvent être classées en deux groupes :

- les protéines du lactosérum ou protéines solubles
- les caséines qui se trouvent sous forme de micelles.

Les principales protéines du lactosérum sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, alors que les immunoglobulines, les protéose-peptones et la lactoferrine sont des protéines quantitativement mineures (ALAIS, 1984). Les séquences de chacune de ces protéines majeures sont élucidées (BREW *et al.*, 1970; BRAUNISTER *et al.*, 1972).

Les micelles de caséines sont dispersées dans la phase aqueuse du lait sous forme de particules d'un diamètre de 20 à 600 nm (RIBADEAU-DUMAS, 1987). Différents types de caséines peuvent être produits par différents procédés industriels.

La caséine native ou phosphocaséinate de calcium est obtenue par ultracentrifugation du lait. La caséine-présure est obtenue par l'hydrolyse par la chymosine qui coupe la fraction glycopeptidique fixée sur la caséine kappa. Ce phospho-paracaséinate de calcium insoluble renferme tous les composants organiques et minéraux de la micelle originale de la caséine. La caséine isoélectrique peut être obtenue par acidification à pH 4,6 ce qui entraîne la précipitation de la masse protidique en raison de l'élimination des phosphates et du renforcement de l'hydrophobicité de la fraction protidique (RIBADEAU-DUMAS, 1987; ALAIS, 1984).

La caséine entière est constituée de 4 fractions majeures : α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN et κ -CN. Les structures primaires de ces fractions majeurs ont été élucidées (MERCIER *et al.*, 1971; RIBADAU-,DUMAS *et al.*, 1972; BRIGNON *et al.*, 1977). Chaque fraction est associée à d'autres éléments qui résultent de modifications post-traductionnelles: protéolyse limitée, glycosylation ou phosphorylation (MERCIER et GAYE, 1982; SWAISGOOD, 1982).

1.2.2.2. Les valeurs nutritionnelles des caséines

Dans les micelles, les caséines sont les composants prédominants auxquels sont associés les macro et oligo-éléments minéraux. Ces liaisons peuvent se rompre facilement : une simple précipitation acide entraîne une forte déminéralisation des protéines (BRULE, 1987). Les proportions des divers composants dans la micelle de caséine figurent dans le tableau 4.

La distribution du phosphore est caractéristique de chaque composant de la caséine, la plus riche étant la caséine α_{s2} (1,12 %), suivie de la caséine α_{s1} (0,99 %), de la caséine β (0,56 %) et de la caséine κ (0,25 %) (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

Les éléments minéraux mineurs tels que le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, le cadmium se concentrent également dans les micelles de caséine à l'état natif. Ces minéraux y sont liés aux sites phosphorylés (BRULE et FAUQUANT, 1982). Cette liaison supposée de nature chimique pourrait expliquer la diminution de ces éléments dans les caséines acides obtenues par une acidification du milieu (BRULE, 1987)).

Certaines vitamines sont également associées aux micelles mais on peut considérer qu'après lavage et séchage l'apport vitaminique des caséines obtenues industriellement est négligeable à cause des pertes pendant les

TABLEAU 4 : COMPOSITION MOYENNE D'UNE MICELLE DE CASEINE (POIFFAIT et ADRIAN, 1986)

	g/100 g sec
α_{s1} caséine	35,6
α_{s2} caséine	9,9
β caséine	33,6
κ caséine	11,9
autres fractions	2,3
calcium	2,9
phosphate	2,9
magnésium	0,1
sodium	0,1
potassium	0,3
ac. citrique	0,4
ac. sialique	0,3
galactose	0,2
galactosamine	0,2

procédés (ADRIAN, 1987). Néanmoins, les caséines industrielles sont des sources appréciables de vitamine B12, quel que soit leur mode d'obtention (POIFFAIT et ADRIAN, 1986). Les diverses fractions de caséine ont une grande capacité de fixation à la vitamine B12. Elle est 10 à 200 fois supérieure aux quantités de vitamines effectivement fixées (GIZIS *et al.*, 1965). De plus, ces fixations sont assez stables puisqu'elles résistent à la pasteurisation et aux opérations de préparation de la caséine (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

La composition en acides aminés de chaque fraction de caséine est variable de l'une à l'autre (tableau 5). La fraction β contient plus d'acides aminés neutres (valine, leucine, proline). Par contre, la proportion d'acides aminés basiques (lysine, arginine), aromatiques (tyrosine) et dicarboxyliques (ac. aspartique) est particulièrement basse. De plus, les acides aminés soufrés comme la cystéine ne se trouvent que dans les fractions α et κ tandis que la fraction β renferme plus de méthionine. L'équilibre entre les acides aminés est comparable à celui des protéines de la viande (HAMBRAEUS, 1985). Les caséines sont déficientes en acides aminés soufrés de 42 % par rapport aux protéines de l'oeuf (tableau 6).

Mais sur le plan de la valeur protidique globale i.e. équilibre en acides aminés, digestibilité et capacité d'absorption par la muqueuse intestinale, ces protéines ont une bonne qualité nutritionnelle (POIFFAIT et ADRIAN, 1986). Selon de nombreuses observations, les peptides obtenus par hydrolyse enzymatique à partir des caséines sont significativement mieux absorbables que leur équivalent en acides aminés purs tant chez l'animal que chez l'homme (SILK *et al.*, 1973; RERAT *et al.*, 1988). Même si cette propriété a été démontrée dans d'autres aliments, elle est plus nette dans le cas des caséines (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

TABLEAU 5 : COMPOSITION DE LA CASEINE EN ACIDES AMINES INDISPENSABLES ET ACCESSOIRES. (SUR LA BASE DE 16 g D'AZOTE OU DE 100 g DE PROTEINE) (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

	(Arg)	(His)	Ile	Leu	Lys	Met	(Cys)	Phe	(Tyr)	Thr	Trp	Val
Lait entier	3,60	2,70	5,90	9,30	7,75	2,55	0,82	5,00	5,00	4,70	1,45	6,50
Caséine :												
moyenne	3,80	2,60	5,80	10,00	7,60	2,95	0,39	5,40	5,70	4,30	1,30	6,20
extrêmes	3,00	1,40	4,90	8,10	6,60	2,45	0,32	4,55	4,65	2,90	1,22	5,70
	4,70	3,45	6,90	10,80	8,85	3,50	0,44	6,00	6,60	4,40	1,34	7,70
α -caséine	4,10	2,90	6,10	7,95	9,10	2,60	0,44	4,65	7,30	4,55	1,30	6,00
β -caséine	3,10	3,10	5,50	11,60	6,50	3,40	0,10	5,70	2,70	5,00	0,65	10,20
γ -caséine	1,90	3,70	4,40	12,00	6,20	4,10	0,00	5,80	3,50	4,50	1,20	10,60
α_2 -caséine	3,90	2,80	5,60	8,65	8,70	2,55	0,30	5,05	7,30	3,45	2,05	5,70
k-caséine	3,60	1,95	6,85	6,30	6,25	1,65	1,00	3,80	6,75	7,20	1,30	6,00
para k-caséine	4,75	2,75	5,75	6,90	9,80	0,90	1,10	5,00	10,50	3,15	1,60	4,95

TABLEAU 6 : COMPARAISON DES TENEURS EN ACIDES AMINES DANS LES PRODUITS LAITIERS ET LES PROTEINES DE L'OEUF (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

	Lait	Caséine	Lactosérum
Ile	-23	-17	+2
Leu	-1	+2	+2
Lys	+10	+8	+55
Met	-30	-19	-30
AA soufrés	-40	-42	-5
Phe	-18	-8	-25
AA arom.	-3	+13	-22
Thr	-12	-18	+5
Trp	-5	-15	+105
Val	-13	-6	-22

Les données sont présentées en % par rapport aux protéines de l'oeuf

Cette caractéristique nutritionnelle distingue les caséines des autres protéines alimentaires et a encouragé la recherche d'autres propriétés biologiques.

1.2.2.3. Caractéristiques biologiques de la caséine

Les propriétés nutritionnelles des caséines dans un régime ne se limitent pas à la fourniture de l'azote pour la biosynthèse des protéines. Au-delà de cet apport en nutriments, elles possèdent :

- 1) des éléments favorables à l'absorption des minéraux et des vitamines
- 2) des activités opioïdes, d'immunomodulation, d'antihypertension et d'antithrombose.

1.2.2.3.1. Effet sur l'absorption minérale et vitaminique

Le rôle de la caséine dans l'absorption du calcium a été mis en évidence par plusieurs auteurs (LEE *et al.*, 1979; MYKKANEN et WASERMAN, 1980; GERBER et JOST, 1986) qui ont constaté que ce sont les groupements phosphorylés de la caséine qui augmentent l'absorption intestinale du calcium (LEE *et al.*, 1979; MYKKANEN et WASERMAN, 1980) et induisent la minéralisation des extraits embryonnaires de fémur, de tibia et de métatarse (GERBER et JOST, 1986). Selon SATO *et al.*, (1986) les phosphopeptides permettent la solubilisation des sels de calcium au niveau de l'intestin grêle ce qui entraîne une absorption passive au niveau de l'iléon. La présence de phosphopeptides provenant de la caséine α -s₁a été mise en évidence par MEISEL et FRISTER (1989) dans le produit de la digestion jéjunale recueilli chez un miniporc après l'ingestion d'un aliment contenant 15-% de caséine. Ce dérivé est le fragment 66-74 de la séquence SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn .

La capacité chélatante élevée des phosphopeptides provoque également la formation des sels organophosphates avec les oligo minéraux tels que Fe, Zn et Cu ce qui augmente leur absorption intestinale (BRULE *et al.*, 1982).

La biodisponibilité du rétinol est améliorée par l'action de la caséine. Cette propriété est maximale au taux de 10 % de caséine dans la ration. Pour cette activité biologique, le rôle des phosphopeptides a été évoqué (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

1.2.2.3.2. Autres activités biologiques

La présence d'exorphines dans les hydrolysats pepsiques de caséine α -s (ZIOUDRU *et al.*, 1979) et de caséine β (BRANT L *et al.*, 1979) a été mise en évidence. Ceci a été attribué à l'enchaînement 60-66 de la caséine β , identifié comme étant la séquence Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile. Celle-ci a été nommée β -casomorphine 7. Le résidu Tyr de ces peptides se fixe aux récepteurs des endorphines (TESCHEMACHER, 1987; PAROLI, 1988). La présence des enchaînements Tyr-X- Phe ou Tyr-X1-X2-Phe est importante dans les peptides à activité opiacée (CHIBA et YOSHIKAWA, 1986). Plus récemment, MEISEL et FRISTER (1989) ont prouvé que les peptides à activité opiacée étaient libérés dans le digestat jéjunale d'un miniporc ayant ingéré de la caséine. Ce peptide a été identifié comme le fragment 60-70 de la β -caséine de séquence Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu et nommé β -casomorphin-11.

L'administration orale d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion (angiotensin converting enzyme) ou ACE est efficace dans le traitement de l'hypertension. L'équipe de MARUYAMA *et al.*, (1987 a,b) a identifié 3 peptides provenant de l'hydrolyse trypsique des caséines ayant cette propriété. Le premier, issu de la caséine α -s₁ du segment 23-34 avec l'enchaînement : Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys est nommé CEI₁₂. Le deuxième est un dérivé du CEI₁₂, appelé CEI₅ avec la séquence : Phe-Phe-Val-Ala-Pro. Le troisième est le segment 177-183 de la caséine β avec un enchaînement :Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg (CEI B7). L'activité inhibitrice de ces peptides sur l'enzyme de conversion testée *in vitro* est classée comme suit : CEI₅ > CEI B7 > CEI₁₂. Plus récemment un quatrième peptide inhibiteur de l'enzyme de conversion, l'hexapeptide de l'extrémité C terminale de la caséine α -s₁ (CEI- α _{C6}) : Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp (MARUYAMA *et al.*, (1987b) a été trouvé par MIGLIORE-SAMOUR *et al.*, (1989) parmi les fragments dérivés des caséines ayant une activité immunostimulante.

Au contraire des données précédemment décrites, d'autres expériences ont montré que des peptides issus des caséines interviendraient dans l'étiologie des maladies coronariennes expérimentales. L'induction de l'athérosclérose par les caséines est associée à une augmentation de la cholestérolémie. Les caséines augmentent notablement le cholestérol non estérifié (TERPSTRA *et al.*, 1982; WEST et BEYNEN, 1985). En effet, les caséino-phosphopeptides semblent avoir des propriétés hypercholestérolémiantes (POIFFAIT et ADRIAN, 1986).

1.2.3. Biochimie d'allergènes alimentaires

1.2.3.1. Caractéristique de l'allergène

Les allergènes isolés ont des masses moléculaires variant entre 10 000 et 70 000 D (MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1982a; TAYLOR *et al.*, 1987; ASS, 1988). Ces tailles moléculaires pourraient être idéales pour la formation de ponts entre deux molécules d'IgE. Pour pouvoir former les ponts entre deux IgE, l'allergène doit avoir au moins deux sites antigéniques. La formation de ces ponts est essentielle pour l'activation membranaire et pour la dégranulation cellulaire (ISHIZAKA, 1985). Cependant, dans la réaction antigène-anticorps la formation de tels ponts n'est pas nécessaire. Ceci pourrait expliquer la différence entre la capacité allergénique et l'antigénicité spécifique d'une molécule trouvée par différentes méthodes de préparation, qui modifient la structure moléculaire et la détermination de l'antigénicité.

Puisque l'allergène est nécessaire dans la formation du pontage entre deux molécules d'IgE, la structure moléculaire devient plus importante que sa taille moléculaire. De plus, cette molécule doit être capable de traverser la paroi intestinale. Les peptides de faible poids moléculaire (haptènes) ne peuvent être allergènes qu'après avoir formé des agrégats par réaction avec des protéines porteuses (MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1982a; ASS, 1988).

Dans les années 1960-70 on supposait que la présence de la partie glucidique et de la liaison N-glycosidique étaient nécessaires à l'activité allergénique. Cependant, en utilisant des molécules de haute pureté, après l'année 1971, il a été démontré que la liaison N-glycosidique n'avait pas d'importance dans la réaction allergénique (ASS, 1988).

Les allergènes sont classés en trois groupes selon leur importance dans la réaction avec les IgE :

- les allergènes majeurs sont des protéines qui donnent *in vitro* une liaison avec au moins 50 % des sérums des patients allergiques au même composant
- les allergènes mineurs donnent une liaison avec 10 % des sérums des malades.

Les allergènes ayant une capacité de liaison entre ces deux taux sont des allergènes intermédiaires. La méthode de radioimmunoélectrophorèse croisée (CRIE) est la plus efficace pour la détermination de l'importance d'un allergène (TAYLOR *et al.*, 1987; ASS, 1988).

Sur le plan de la structure d'un allergène, il est proposé deux types de déterminants ; ce sont le type discontinu et le type séquentiel. Le premier type est fondé sur le fait que quelques sites, plus ou moins indépendants de l'intérieur de molécule, déterminent l'antigénicité de la protéine. Cependant, les déterminants sont souvent éliminés par l'hydrolyse. Ce type de déterminant est souvent appelé déterminant topographique. Le type séquentiel décrit un déterminant qui est composé d'une séquence linéaire prolongée d'acides aminés (MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1982a; ASS, 1988; BALDO et DONOVAN, 1988).

1.2.3.2. Méthode de détermination de l'allergénicité d'une molécule

La méthode de diagnostic utilisée dans les explorations de toute pathologie allergique est également appliquée à l'exploration de l'allergénicité d'une substance soupçonnée responsable. Les tests cutanés et les divers tests biologiques *in vitro* : dosages d'immunoglobulines spécifiques, tests de dégranulation des basophiles (TDBH), tests de libération d'histamine (THL), test de transformation lymphoblastique (TTL), sont souvent employés pour la détermination d'un allergène. Les étapes d'extraction et de purification constituent la préparation biochimique préliminaire. Ensuite, on effectue le test de provocation chez des sujets allergiques ou des animaux sensibilisés au composant correspondant (TAYLOR *et al.*, 1987; CANT, 1988).

Parmi les allergènes alimentaires, l'allergène M de morue est le mieux caractérisé. Il est purifié par chromatographie de gel d'exclusion suivie par une focalisation isoélectrique. La purification est contrôlée par le test cutané. L'allergène M est constitué de 113 résidus d'acides aminés et 1 glucose, avec une masse moléculaire de 12338 et un point isoélectrique de 4,75. Sa structure tridimensionnelle comporte 3 boucles (AB, CD, EF). Les deux dernières ont une capacité de liaison avec le calcium, comme la calmoduline. Cet allergène contient plusieurs sites ayant une capacité de liaison avec l'IgE. Les séquences 49-64 dans la région CD, 88-103 en EF et 13-32 en AB sont des peptides de haute activité allergénique et de poids moléculaire d'environ 2500 - 3000 D (ELSAYED et ASS, 1971; ELSAYED *et al.*, 1980; ELSAYED et APOLD, 1983; AAS, 1988). Après l'analyse de la séquence en acides aminés dans ces fragments, AAS (1988) a proposé le modèle hypothétique pour les séquences de déterminant allergénique (figure 4). Le fragment peptidique de résidus 41-64 de l'allergène M, contient 3 tétrapeptides décrits séparés l'un de l'autre par deux segments de 6 résidus d'acides aminés. ELSAYED et APOLD (1983) ont synthétisé le fragment 49-64 de l'allergène M, ce peptide synthétique se fixe aux IgE des sérums des sujets allergiques à la morue et aux IgG anti allergène M de lapin.

Dans le but de rechercher la structure allergénique de protéines du lait, WAHN (1988) a choisi l'albumine du sérum bovin (ASB) dont la séquence d'acides aminés est bien établie. La molécule a été hydrolysée par la pepsine en deux fragments ASB-P-1-306 et ASB-P-307-582. Un troisième fragment, ASB-T-377-582 provient de l'hydrolyse trypsique. L'allergénicité est contrôlée par le test de libération de l'histamine des basophiles (TLHB) de sujets allergiques ou de lapins sensibilisés au ASB. Les résultats montrent que, bien que l'activité allergénique des fragments soit plus faible que l'ASB intacte, il existe 4 déterminants antigéniques dans la molécule de ASB.

L'allergénicité des protéines du lait bovin est évaluée également par le test cutané à partir de protéines purifiées. GOLDMAN *et al.*, (1963) ont prouvé la positivité du test chez 50 des 85 sujets allergiques au lait : 34 réactions positives pour la caséine, 22 pour l' α -lactalbumine, 20 pour la β -lactoglobuline et 21 pour l'albumine du sérum. En utilisant le même test cutané, BLEUMINK *et al.*, (1968) ont rapporté que c'était la β -lactoglobuline qui était la plus réactive.

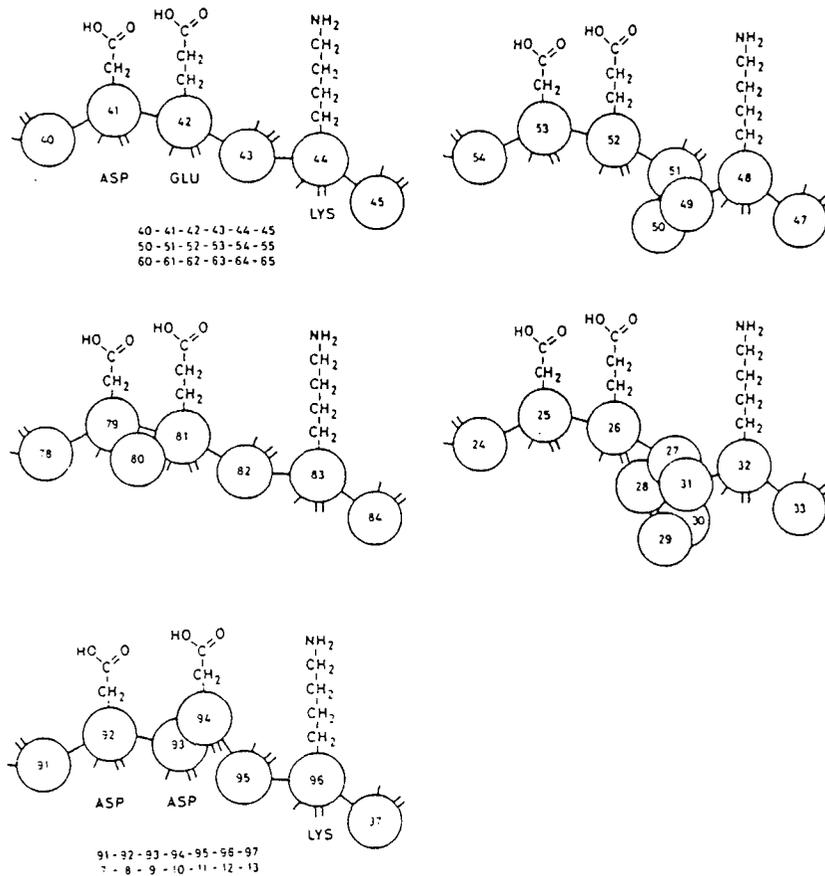


Figure 4. Hypothèse sur la séquence et la conformation des acides aminés formant les épitopes des allergènes M de la morue (AAS, 1988)

D'autres tests immunologiques tels que le transfert passif et le test radioallergosorbent (RAST) sont également utilisés pour détecter l'allergène spécifique aux IgE. LELONG *et al.*, (1986) ont comparé les taux des IgE spécifiques par dosage radioimmunologique (RAST) vis-à-vis des diverses protéines du lait chez 76 enfants eczémateux. Ils ont montré que le lait entier a donné les réponses les plus fréquemment positives (77 %). Parmi les diverses protéines, c'est l' α -lactalbumine qui a donné le plus de réponses positives (59 %), suivie par la β -lactoglobuline (51 %) puis la caséine (18 %). Plusieurs articles ont été publiés (TAINIO et SAVILAHTI, 1987; CAMPBELL *et al.*, 1987; MALIK *et al.*, 1988; ASSELIN *et al.*, 1988) sur ce sujet.

La recherche de sites antigéniques des protéines du lait après hydrolyse enzymatique ou chimique en utilisant une méthode immunologique a été récemment rapportée. L'équipe d'OTANI (OTANI *et al.*, 1985a; OTANI *et al.*, 1985b) a identifié des sites antigéniques de la β -lactoglobuline-lactosée (Lac- β -Lg) dans la séquence d'acides aminés 25-61. Ces sites antigéniques ont été contrôlés par le test ELISA d'inhibition. En utilisant la méthode du test anaphylaxique cutané chez le cochon d'Inde, cette équipe a montré que le lactose lié à la β -lactoglobuline par la réaction de Maillard contribue à

l'antigénicité de la Lac- β -Lg. Les sites antigéniques de la caséine α_1 et β sont également déterminés par la méthode d'immunoprécipitation (OTANI *et al.*, 1984a; OTANI *et al.*, 1984b; OTANI *et al.*, 1985; OTANI *et al.*, 1986).

La possibilité de préparer des antigènes et allergènes purifiés permet une standardisation et la réalisation d'une immunothérapie spécifique. En raison de leur précision, les dosages des allergènes majeurs à l'aide des anticorps monoclonaux sont appelés à être de plus en plus utilisés à la fois pour la standardisation des allergènes et pour l'évaluation précise de la charge allergénique de l'environnement (CHAPMAN, 1988). L'utilisation d'anticorps monoclonaux pour la mesure d'allergènes n'a été développée que très récemment. Leurs avantages et utilisations sont déjà évidents dans la détermination d'allergènes des ascariens de la poussière de maison. Ces anticorps monoclonaux permettent de très bien différencier les allergènes de différentes espèces d'ascariens qui ont des propriétés physiques communes et un haut degré d'antigénicité et d'allergénicité croisées (HEYMANN *et al.*, 1986; PLATTS-MILLS *et al.*, 1986; CHAPMAN *et al.*, 1987). Cette réactivité croisée est très importante sur le plan du diagnostic et sur le plan thérapeutique (SCHEINMAN et PAUPE, 1988).

La méthode "d'immunoblotting" possède également une haute valeur pour la détection de déterminants allergéniques qui peuvent fixer l'IgE. Elle est préférentiellement utilisée pour la révélation de polypeptides après avoir été "dépliés" par le dodécylsulfate de sodium. Très récemment HOLEN et ELSAYED (1990) ont révélé pour la première fois que les 4 protéines de l'oeuf, l'albumine, l'ovomucoïde, l'ovotransferrine et particulièrement le lysozyme sont les allergènes majeurs du blanc d'oeuf. L'allergénicité de ces protéines a été démontrée par la technique immuno-autoradiographique après séparation des protéines par l'électrophorèse bidimensionnelle et transfert sur une membrane de nitrocellulose.

L'utilisation de la technique de l'ADN recombinant pour l'isolement et la caractérisation d'allergènes et de déterminants allergéniques est proposée. La stratégie de clonage d'allergènes pour l'identification de séquences allergéniques et la détection de réactivités croisées de déterminants allergéniques de sources différentes a déjà été utilisé par différents auteurs (BALDO et DONOVAN, 1988).

1.2.4. Allergénicité du lait

L'allergie au lait bovin est connue depuis de nombreuses années. Hippocrate (460-370 AJC) a observé que la consommation du lait pouvait amener des perturbations gastrointestinales et de l'urticaire (MACDONALD, 1988). Toutefois, les rapports scientifiques n'ont commencé à apparaître dans la littérature qu'après 1910, une dizaine d'années après l'introduction dans l'alimentation des nourrissons d'aliments commerciaux à base de lait (SAVILAHTI et VERKASALO, 1984).

L'allergie au lait comprend toutes les réactions liées à l'ingestion d'un allergène du lait et mettent en jeu un mécanisme immunologique. Dans ce cas, il serait plus exact de parler d'hypersensibilité au lait, mais en pratique le terme d'allergie reste habituellement utilisé. L'ingestion du lait peut

le terme d'allergie reste habituellement utilisé. L'ingestion du lait peut aboutir également à d'autres réactions qui n'impliquent pas un mécanisme immunologique. Ce dernier phénomène correspond à des réactions résultant d'un déficit enzymatique, d'une intoxication ou d'une idiosyncrasie. Le terme d'intolérance au lait est réservé à ces réactions (PAUPE, 1988b).

La protéine du lait de vache constitue une des principales sources d'allergie alimentaire (LAMY *et al.*, 1963; COOMBS *et al.*, 1978; WALKER-SMITH, 1982; VISAKORPI, 1988). Elle est incriminée dans les allergies alimentaires de l'enfant et pour un cinquième de celles de l'adulte (MONERET-VAUTRIN, 1986). Il est estimé que la réaction allergique aux protéines du lait de vache frappe de 1 % à 3 % des nourrissons mais CANT avance des chiffres de 0,3 % à 7 % (CANT, 1988). Cependant, il est constaté que dans le cadre d'une technologie moderne correctement utilisée, ce problème ne devrait toucher que 0,5 % de la population humaine (MENDY *et al.*, 1981).

1.2.4.1. Symptômes de l'allergie au lait

Pour simplifier la complexité des réactions pathologiques de l'allergie, on peut classer les symptômes observés en manifestations digestives ou extradiigestives (VENTURA et GRECO, 1988).

Les manifestations gastro-intestinales que l'on observe dès le plus jeune âge, apparaissant quelques minutes ou quelques heures après la prise d'un biberon avec vomissements, diarrhée, météorisme abdominal et des colites (SAVILAHTI et VERKASALO, 1984; PAUPE, 1988b; VISAKORPI, 1988). Le terme d'entéropathie de la protéine du lait (CMPE) est une maladie du nourrisson décrite sous le nom de gastroentérite chronique au lait de vache où l'intervention d'IgE est observée. Les lésions morphologiques (biopsie de la muqueuse intestinale) peuvent être très proches de celles de l'hypersensibilité au gluten, avec une atrophie villositaire partielle ou totale des infiltrations de lymphocytes ou d'éosinophiles (SAVILAHTI et VERKASALO, 1984; CANT, 1988; PAUPE, 1988b). Les diarrhées chroniques avec malabsorption, risques de déshydratation, pertes de sang et de protéines dans les selles sont souvent en rapport avec l'ingestion du lait de vache (ZIEGLER *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1990).

Les manifestations extradiigestives comprennent la dermatite atopique et l'urticaire. Un urticaire chez un nourrisson évoque avant toute chose une allergie au lait de vache, même en l'absence de tout signe digestif (PAUPE, 1988b; VENTURA et GRECO, 1988). Les protéines du lait de vache participent également au déclenchement de rhinites ou d'asthme chez l'enfant (CANT, 1988; VISAKORPI, 1988). Le choc anaphylactique est rare mais possible au cours de l'allergie au lait de vache (VENTURA *et al.*, 1981) et au blanc d'oeuf (PAUPE, 1988b). Il a parfois été invoqué comme origine d'une mort subite inexplicée (DEVEY *et al.*, 1976; PETRUS *et al.*, 1989).

Comme toute allergie alimentaire, cette réaction survient le plus souvent chez des sujets atopiques c'est-à-dire ayant une programmation génétique capable d'élaborer une grande quantité d'immunoglobines IgE et de déclencher avec facilité une réponse allergique aux IgE spécifiques. Ce

COOMB ou dans le type hypersensibilité immédiate IgE-dépendant (CANT, 1988; PAUPE, 1988b). Toutefois, d'autres types de réponse immunologique ont été constatés comme l'association IgG/IgM aux protéines du lait chez des malades (BJORKSTEN *et al.*, 1983; AHLSTEDT *et al.*, 1987; BRENEMAN *et al.*, 1989; EL RAFEI, *et al.*, 1989).

La manifestation digestive n'est pas toujours indépendante des IgE. Il est également possible de grouper les symptômes d'allergie au lait en fonction de leur mécanisme, selon que ce dernier est purement de type I (hypersensibilité immédiate IgE-dépendant), de type II (mixte avec une intervention partielle des IgE) ou de type IV (retardé) (PAUPE, 1988a).

1.2.4.2. Tests de diagnostics immunologiques

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude du diagnostic de l'allergie alimentaire. Ces travaux sont frustrants à cause de la complexité physiopatho-immunologique de la réaction (VISAKORPI, 1988). Les signes diagnostiques de l'allergie et de l'intolérance au lait de vache sont présentés dans le tableau 7.

TABEAU 7 : TEST DU DIAGNOSTIC DE L'ALLERGIE / INTOLERANCE AU LAIT DE VACHE

Intolérance (WECK, 1988)	Test d'absorption du xylose Test de tolérance aux lactose et sucrose Test des leucocytes fécaux, lipides fécaux Biopsie d'intestin
Allergie	Test cutané aux protéines de lait (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988) Dosage des IgE totales (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988) Dosage des IgE spécifiques au lait (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988) Dosage des subclasses des IgG, IgA, Ig du lait (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988) Test de transformation lymphoblastique (WECK, 1988; TAINIO et SAVILAHTI, 1990) Test d'inhibition de migration des leucocytes (LIF) (WECK, 1988) Test de dégranulation des basophiles (PAUPE et SCHEINMANN, 1988; DUPONT <i>et al.</i> , 1989) Test de libération d'histamine (PAUPE et SCHEINMANN, 1988; DUPONT <i>et al.</i> , 1989) Test de perméabilité intestinale (DUPONT <i>et al.</i> , 1989; ANDRE <i>et al.</i> , 1989) Régimes d'exclusion (WECK, 1988; ANDRE <i>et al.</i> , 1989) Test de provocation orale avec un placebo témoin (WECK, 1988; ANDRE <i>et al.</i> , 1989).

La grande variété des protéines du lait, la diversité des mécanismes immunologiques sont les facteurs contribuant à la complexité de la pathogénie de la maladie (WECK, 1988; VISAKORPI, 1988). Nous ne présenterons ici que les méthodes utilisées dans ce travail.

1.2.4.2.1. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Des étapes préalables sont nécessaires afin qu'un lymphocyte soit capable de synthétiser des anticorps. En effet, il doit être activé par un antigène qui va stimuler la transformation lymphoblastique et la division cellulaire avant de produire des anticorps (ROÏT *et al.*, 1985). Le phénomène de transformation lymphoblastique peut être réalisé *in vitro* à partir de lymphocytes activées en utilisant le même antigène stimulant. Ceci est appelé la transformation lymphoblastique spécifique ou antigénique. Par ailleurs, certains agents comme la phytohémagglutinine (PHA) peuvent stimuler la transformation des lymphocytes en culture de façon non-spécifique (JANOT *et al.*, 1970; CAVAILLON et DAVID, 1987).

La transformation lymphoblastique est l'état d'un blaste susceptible de proliférer. Ce phénomène est l'aboutissement d'une série de processus biochimiques complexes que l'on peut résumer de la façon suivante (JANOT *et al.*, 1970; CAVAILLON et DAVID, 1987) :

- a. Activation membranaire
- b. Activation nucléaire
- c. Synthèse de protéines
- d. Transformation morphologique
- e. Synthèse d'ADN
- f. Mitose

Pratiquement, l'étape de synthèse d'ADN mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée est largement utilisée pour quantifier le taux de transformation lymphoblastique (CAVAILLON et DAVID, 1987). Grâce à ces caractéristiques, le TTL est employé dans de nombreuses études pour révéler l'état d'hypersensibilité induite par les aliments (TAINIO et SAVILAHTI, 1990), les allergènes non alimentaires (NOMA *et al.*, 1989), et les médicaments (CAVAILLON et DAVID, 1987). Il est aussi utilisé pour montrer la capacité immunogénique d'un produit alimentaire (TORRE et OLIVER, 1989).

1.2.4.2.2. Test de libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM)

Cette méthode représente une approche plus précise de la dégranulation immunologique. Celle-ci est effectuée *in vitro* en utilisant des cellules (basophiles, mastocytes) portant les récepteurs membranaires d'IgE et contenant des médiateurs. L'antigène induisant l'IgE spécifique est mis en contact avec les cellules dans un milieu défini et l'histamine libérée dans le surnageant est dosée après incubation et centrifugation (PAUPE et SCHEINMANN, 1988). La quantité d'histamine totale peut être obtenue par éclatement de cellules. Cette méthode permet de détecter la présence d'IgE

1.2.4.2.3. L'intérêt du dosage d'anticorps

Le dosage des IgE sert à explorer l'état d'hypersensibilité immédiate (type I). Il est très utile lorsque les tests cutanés risquent d'être dangereux. Le dosage est souvent réalisé par la méthode de "radioallergosorbent test" (RAST) : l'allergène est fixé sur une rondelle de cellulose, ce support étant mis au contact du sérum à étudier. Le complexe support-antigène-anticorps est ensuite marqué par une anti-IgE radioactive. La radioactivité résiduelle mesurée est proportionnelle au nombre de molécules d'anticorps fixées sur le support (WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988).

Une équipe de pédiatres italiens (1988) a récemment publié leur travail sur l'allergie au lait de vache (CMPA) chez 303 nourrissons dans leur première année (VENTURA et GRECO, 1988). Ces enfants présentent tous des symptômes gastro-intestinaux et extradigestifs d'allergie au lait de vache. Les résultats de ces chercheurs confirment l'étroite corrélation entre l'hérédité de la CMPA, la gastroentérite aiguë préalable et la manifestation pathologique. De plus, 77 % des enfants ayant des symptômes extradigestifs possèdent des taux d'IgE spécifiques sériques élevés. Par contre, cette immunoglobuline est peu liée aux réactions digestives (33 % positives).

Le dosage des IgG spécifiques et de leurs sous-classes est intéressant pour le diagnostic d'allergie au lait de vache ou alimentaire en général. On constate assez souvent la présence d'IgG₄ spécifiques des allergènes alimentaires (lait de vache et oeuf) (KEMENY *et al.*, 1986; URBANEK et KEMENY, 1988;) mais il n'existe aucune corrélation entre les symptômes d'allergie et la présence d'IgG₄ spécifiques d'un allergène. Ce dosage a mis en évidence que les IgG₄ semblent capables tantôt de sensibiliser et tantôt de protéger vis-à-vis de ces allergènes (EL RAFEI *et al.*, 1989). Ces comportements différents semblent dépendre de la concentration en allergène (EL RAFEI *et al.*, 1989; URBANEK et KEMENY, 1988; KEMENY *et al.*, 1986).

1.2.4.3. Les allergènes du lait bovin

Le terme allergène est réservé aux molécules ou fragments de molécules qui peuvent réagir avec l'IgE et entraîner une manifestation immunologique adverse. En principe, toutes les protéines du lait sont des allergènes potentiels si l'on compare les degrés de séquence homologues des protéines humaines et bovines (tableau 8) (JOST, 1988).

L'allergénicité des fractions majeures du lait de vache a été évaluée chez les individus allergiques (BJORKSTEN *et al.*, 1983; GJESING *et al.*, 1986; FIRER *et al.*, 1981; FREIER *et al.*, 1983). Il est évident que de multiples allergènes existent dans le lait de vache et les protéines majeures sont également les allergènes majeurs (PAHUD *et al.*, 1988). Ces protéines sont la β -lactoglobuline (60-80 % des patients allergiques au lait), la caséine (60 %), l' α lactalbumine (50 %), l'albumine sérum (50 %) (ASS, 1988). La β -lactoglobuline est considérée comme l'antigène majeur (HOFFMAN et HADDAD, 1974; MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1982a,b) et le variant A est plus antigénique que le variant B (MALIK *et al.*, 1988). D'autres auteurs ont

trouvé que l' α -lactalbumine était le composant du lactosérum ayant la capacité de liaison la plus forte aux IgE (WAHN et GANSTER, 1982). Plus récemment, il a été rapporté que ce sont les caséines qui sont les plus allergènes (WAHN et GANSTER, 1982; LELONG *et al.*, 1986; OTANI *et al.*, 1989). Considérant leur proportion élevée dans les protéines du lait, les caséines seront les antigènes majeurs. Cependant, dans la fabrication de quelques produits industriels, cette proportion peut être modifiée avec une augmentation de la proportion de protéines du lactosérum. Ceci entraîne des recherches sur l'allergénicité des protéines du lactosérum (WAHN, 1988; JOST, 1988).

TABLEAU 8 : PROPRIETES DES PROTEINES MAJEURES DU LAIT DE VACHE LIEES A LEUR POTENTIEL ALLERGENIQUE

Caractéristiques	Caséines				Protéines du lactosérum			
	α_{s1}	α_{s2}	β	κ	β -LG	α -LA	ASB	IgG
Concentration g/l	12-15	3-4	9-11	2-4	3-4	0,6-1,5	0,4	0,4-0,8
Poids moléculaire	23.600	25.200	24.200	19.000	18.300	14.200	66.300	150.000
Séquence homologue protéine bovine/pro- téine humaine (%)	nd ^a	nd	47 ^b	faible ^c	25 ^d	72 ^e	80	nd

a : nd (Non déterminé)

b : Caséine majeure du lait humain

d : Pas d'équivalence dans le lait humain

e : L' Ig majeure du lait humain est l'IgA

1.2.4.4. Effet du traitement physico-chimique

1.2.4.4.1. Traitement thermique

Les déterminants allergéniques d'allergènes alimentaires n'ont pas tous les mêmes résistances à la dénaturation par la chaleur et à l'hydrolyse enzymatique. Les allergènes des fruits et légumes ne sont pas résistants à la chaleur. Les allergènes de pomme de terre et de la pomme sont éliminés à la cuisson (RAGHUBIR, 1981). Toutefois, les oeufs, la noisette, les poissons et les fruits de mer provoquent des réactions allergiques quelque soit le mode de préparation (TAYLOR *et al.*, 1987; ASS, 1988).

Les travaux sur l'allergénicité de la caséine ont démontré que le traitement par la chaleur n'élimine pas son activité allergénique (JOST, 1988). Par contre, celles des protéines du lactosérum sont éliminées presque

complètement (MELAUGHLAN *et al.*, 1981). JOST (1988) a suggéré que la thermostabilité caractéristique des caséines est liée à leur structure moléculaire. La caséine contient moins de structures secondaires (α -hélice et β -plissée) ce qui la rend plus thermostable. Les protéines du lactosérum subissent une rupture de l'hélice qui entraîne une dénaturation irréversible à partir de 60°C (ALAIS, 1984). JOST (1988) constate donc que les protéines du lactosérum sont plus favorables à la préparation des produits hypoallergéniques commerciaux.

1.2.4.4.2. Traitement par hydrolyse

L'élimination de l'antigénicité par hydrolyse enzymatique a été évoquée pour la caséine (TAKASE *et al.*, 1979) et les protéines du lactosérum (PAHUD *et al.*, 1985). Cependant d'autres auteurs ont rapporté la présence d'anticorps IgE spécifiques anti hydrolysats peptidiques de la β -lactoglobuline (HADDAD *et al.*, 1979; BUSINCO *et al.*, 1989; CHANDRA *et al.*, 1989; PLEBANI *et al.*, 1990) et des protéines du lait (SPIES *et al.*, 1969). Ce dernier auteur pense qu'il y a une formation de nouvelles molécules antigéniques pendant la digestion. HEPPELL *et al.*, 1987, a suggéré que la digestion pourrait agir sur le site antigénique tantôt en le détruisant, tantôt en l'exposant à la surface de la molécule.

Outre ces résultats contradictoires, la fragmentation des molécules de protéines par l'hydrolyse chimique ou enzymatique, sert d'étape initiale pour étudier les épitopes. ELSAYED *et al.*, (1980) et ELSAYED et APOLD (1983) ont déterminé en détail les caractéristiques des allergènes M de morue après avoir hydrolysé la molécule. OTANI *et al.*, (1984, 1986) ont localisé les sites antigéniques de la caséine α -s₁ et de la caséine β par la méthode d'immunoprécipitation de leurs hydrolysats enzymatiques. Toutefois, l'antigénicité d'une molécule observée par la méthode immuno-chimique ne peut aboutir à une réaction allergique *in vivo* que si la molécule peut traverser la paroi intestinale (ASS, 1988).

Malgré les efforts pour l'élimination de l'allergénicité des protéines du lait par hydrolyse enzymatique, les résultats ne sont pas encore tout à fait satisfaisants. Très récemment, BUSINCO *et al.*, (1988) et PLEBANI *et al.*, (1990) ont rapporté que l'hydrolysats de protéines du lactosérum bovin commercial a induit une réaction anaphylactique chez des nourrissons ayant les symptômes d'allergie au lait bovin. CHANDRA *et al.*, (1989) ont publié qu'un régime à base d'hydrolysats de protéines du lactosérum réduit le nombre d'enfants allergiques au lait bovin tout en ne résolvant pas tous les problèmes.

1.2.5. L'intestin, la porte d'entrée d'allergènes alimentaires

La connaissance de la destinée des allergènes alimentaires dans le tube digestif et des systèmes immunitaires de la muqueuse intestinale est fondamentale pour mieux comprendre la pathologie de l'allergie alimentaire. Toutefois, la diversité de ces manifestations et des propriétés des allergènes eux-mêmes ne permet pas de définir précisément le mécanisme qui conduit

La connaissance de la destinée des allergènes alimentaires dans le tube digestif et des systèmes immunitaires de la muqueuse intestinale est fondamentale pour mieux comprendre la pathologie de l'allergie alimentaire. Toutefois, la diversité de ces manifestations et des propriétés des allergènes eux-mêmes ne permet pas de définir précisément le mécanisme qui conduit à la sensibilisation. Nous essayons de résumer les résultats de travaux publiés concernant le mécanisme de l'étape initiale dans la sensibilisation alimentaire.

1.2.5.1. Modalités de l'absorption des protides, peptides et acides aminés

Au niveau des bordures en brosse duodénale et jéjunale, des peptides résultant de la digestion pepsique et pancréatique sont hydrolysés uniquement par des aminopeptidases en acides aminés et peptides. Ces substances sont transportées dans l'entérocyte où les peptides sont hydrolysés par des peptidases intra-cellulaires (MATTHEW, 1975).

Il existe plusieurs systèmes de transport pour les acides aminés : les acides aminés L neutres sont absorbés par un système de transport actif ; les acides aminés L dibasiques et la cystéine sont activement absorbés par un autre système ; les acides iminés (proline et hydroxyproline) sont absorbés par un système transporteur commun à la glycine, à la sarcosine (N-méthylglycine) et à la bêtaïne (N-triméthylglycine). Il semble exister un transporteur pour les acides aminés dicarboxyliques. Néanmoins, il existe des interactions de ces divers systèmes entre eux et avec les systèmes de transport du glucose et du Na⁺ (ADIBI, 1971).

Certains di et tripeptides peuvent traverser sans hydrolyse la barrière intestinale (ADIBI, 1971). Le mécanisme est particulièrement efficace et le transport est plus rapide que celui des acides aminés (MATTHEW, 1975). L'amélioration de l'absorption des acides aminés sous forme de dipeptides est d'une nature différente de celle des disaccharides. Il est probable que l'absorption des protéines s'effectue principalement sous forme de dipeptides (BERNIER *et al.*, 1988).

L'absorption par diffusion passive des peptides est évidente car la muqueuse de l'intestin grêle laisse passer avec un rendement non négligeable des molécules dont la taille est inférieure à 1000 Da. Or, tous les dipeptides ont une dimension inférieure à cette valeur ; leur diffusion passive est donc possible et a d'ailleurs été confirmée expérimentalement (GARDNER, 1983).

Le nouveau-né peut absorber certaines protéines intactes par pinocytose. En effet, plusieurs études avec des modèles protéiques tels que la peroxydase de raifort (HRP) (DUCROC *et al.*, 1983), la lactoglobuline (HEYMANN *et al.*, 1986) et l'albumine de sérum bovin (MARCON-GENTY *et al.*, 1985; HUSBY *et al.*, 1985) ont prouvé que des macromolécules sont absorbées à travers l'épithélium intestinal des hommes et des animaux adultes. Ils ont indiqué que le passage transépithélial des protéines est notamment transcellulaire et procède par endocytose au niveau de la membrane luminale, suivi par le transfert intracellulaire et l'exocytose par la membrane basolatérale.

défense de la barrière muqueuse intestinale. Le tableau 9 montre la liste des composants qui forment la barrière mucosale efficace.

Le processus non immunologique indépendamment ou avec le système immunologique de la muqueuse locale forme collectivement une barrière efficace contre l'attachement et la pénétration des antigènes et des fragments présents dans la lumière intestinale.

TABLEAU 9 : COMPOSANTS REPRESENTATIFS DE LA BARRIERE MUCOSALE AUX ANTIGENES/FRAGMENTS/ALLERGENES (WALKER, 1988).

-
- Non immunologique
 - Intraluminaire :
 - Barrière gastrique (destruction par HCl)
 - Protéolyse
 - Péristaltisme
 - Surface muqueuse :
 - Couches mucosales
 - Membrane des microvillosités
 - Immunologique
 - IgA sécrétoires
 - Combinaison immunologique et non immunologique
 - Libération de la muqueuse des cellules de goblet médiée par le complexe immunologique
 - Protéolyse à la surface de la muqueuse facilitée par le complexe immunologique
 - Phagocytose du complexe immunologique par la cellule de Kupffer
-

1.2.5.2.1. La barrière immunologique

La paroi intestinale contient un système immunologique local ou "gut associated lymphoid tissue" (GALT) disséminé dans le chorion de la muqueuse et concentré par endroits en follicules lymphoïdes. Le système GALT est résumé dans la figure 5.

La réponse IgA sécrétoire par les plasmocytes sous-épithéliaux de la *lamina propria* est considérée comme une barrière empêchant les antigènes alimentaires d'atteindre les cellules immunocompétentes. Les IgA forment des liaisons avec la glycocalix liées aux microvillosités et assurent l'exclusion antigénique (EDWARD, 1978; MACHTINGER et MOSS, 1986; HERBERT et SCHWARTZ, 1987). Les IgE spécifiques fixées sur les mastocytes dans la muqueuse interviennent probablement dans l'élimination de certains antigènes. Ces IgE libèrent l'histamine de cellules de manière très mesurée. L'histamine, chimiotactique pour les éosinophiles, induit la phagocytose du complexe antigène-IgE (DURKIN *et al.*, 1981; CAPRON et DESSAINT, 1990). Les facteurs génétiques qui régulent la synthèse des IgE sont capables d'augmenter la réponse IgE vis-à-vis des antigènes alimentaires. Les médiateurs libérés par ces cellules peuvent

également altérer la perméabilité de la membrane intestinale (PAUPE, 1988b).

1.2.5.2.2. Réponse par les lymphocytes à l'introduction de l'antigène

Une fois la barrière muqueuse franchie, l'antigène peut pénétrer dans l'espace interstitiel basilaire et gagner la *lamina propria*. La pénétration se fait surtout au niveau des cellules M à la surface des plaques de Payer (voir figure 5). Les cellules M sont beaucoup plus perméables puisqu'elles ne possèdent pas de bordure en brosse. Elles permettent la pénétration des antigènes par pinocytose. Les antigènes sont ensuite captés par les macrophages porteurs d'antigènes d'histocompatibilité de classe II et présentés aux lymphocytes T auxiliaires ou suppresseurs, puis aux lymphocytes B ou aux lymphocytes T effecteurs. La stimulation antigénique alimentaire peut donc être tolérogène ou immunogène (PAUPE, 1988b; WALKER, 1988; REVILLARD *et al.*, 1988).

Le phénomène de tolérance comprend la sécrétion d'IgA et l'inhibition préférentielle de la stimulation de la synthèse d'IgE/IgG. Il s'accompagne de la stimulation de cellules T suppresseurs (T_S) qui module la conversion des lymphoblastes en plasmocytes prédisposés à produire des anticorps systémiques. Seuls les antigènes alimentaires T_S dépendants sont tolérogènes (WALKER, 1988) (Figure 6).

La réaction tolérogénique a été récemment établie par des observations de réponses d'hypersensibilité retardée chez des souris recevant de l'ovalbumine d'oeuf (GAUTAM et BATTISTO, 1985; MOWAT, 1986; MOWAT, 1987). Les auteurs ont constaté que les réponses tolérogénique comprennent la filtration ou digestion de la protéine par l'intestin, suivie par l'internalisation dans le système réticuloendothéliale et l'activation de cellules T_S. L'altération d'un de ces composants dans le système de tolérance serait susceptible d'entraîner une réaction immunologique systémique (IgG/IgE).

Selon VUITTON et SEILLES (1989), l'immunologie intestinale semble caractérisée par des interactions multiples entre les cellules du système immunitaire sous la dépendance du lymphocyte T et de ses lymphokines et les cellules épithéliales elles-mêmes. RIHOUX (1988) a constaté qu'un déficit en lymphocytes T_S se traduit par une production anormalement élevée d'IgE. La présence de cellules T activées dans la *lamina propria* de l'intestin chez des sujets ayant des maladies gastro-intestinales telles que la maladie coeliaque, la diarrhée chronique et l'inflammation de la muqueuse a été récemment précisée par MAC DONALD (1990). ISHIZAKA *et al.*, (1987) après avoir étudié différentes populations de lymphocytes T isolés proposent qu'un lymphocyte T porteur de récepteurs pour IgE (Fc-ε) produirait soit un facteur suppresseur de l'allergie (SFA) soit un facteur activateur de l'allergie (EFA, enhancing factor of allergy). Le SFA exerce sur le lymphocyte B un effet suppresseur en ce qui concerne la production d'IgE, tandis que l'EFA exerce l'effet opposé. D'un point de vue chimique, ces deux lymphokines (leur origine sont des lymphocytes) diffèrent par leur degré de glycosylation. L'EFA est plus glycosylé que le SFA. Le degré de glycosylation de ces lymphokines déterminerait s'ils sont du type activateur ou du type suppresseur (ISHIZAKA *et al.*, 1985).

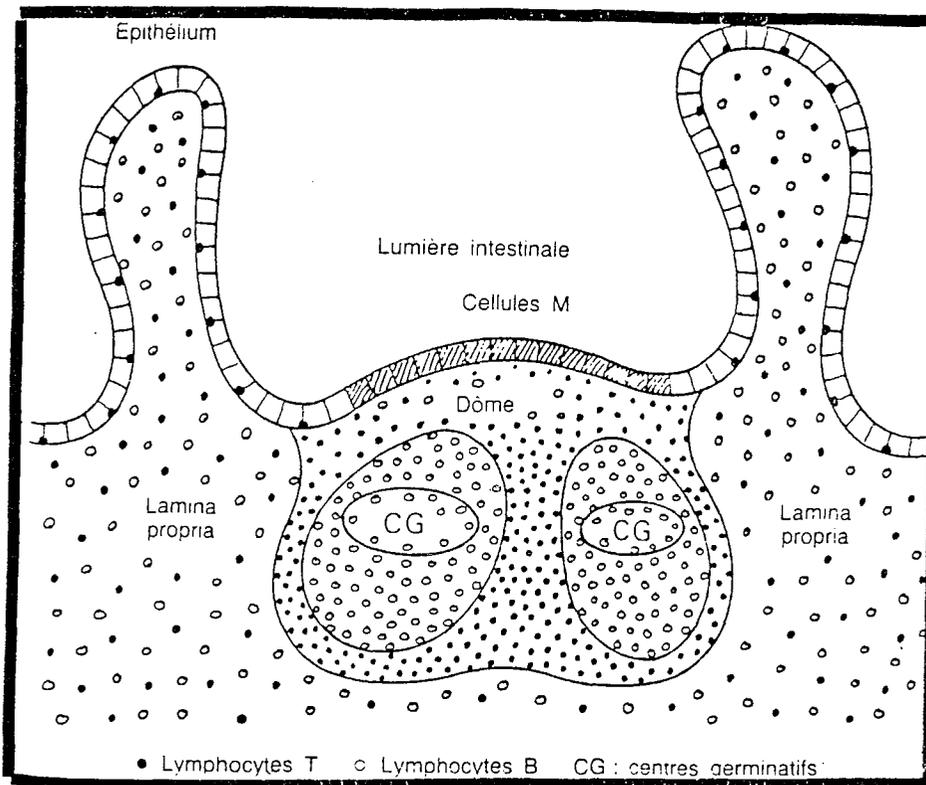


Figure 5. Le système immunologique local de la paroi intestinale

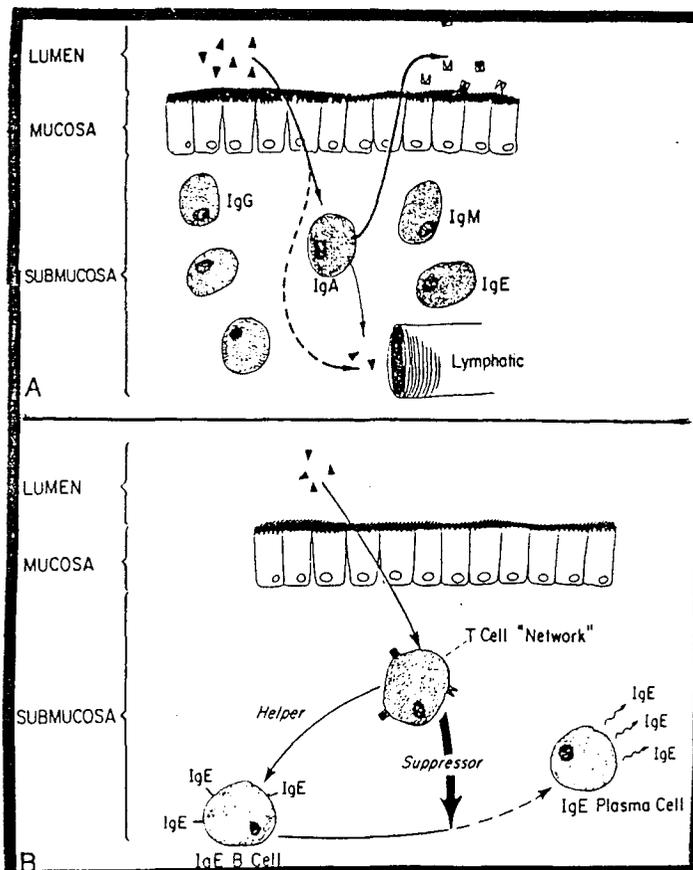


Figure 6. Réponse immunologique à la stimulation antigénique au niveau intestinal

A - Les plasmocytes localement préalablement sensibilisés sont stimulés à produire les IgA

B - Les antigènes pourraient stimuler les lymphocytes T-suppresseurs, ce qui contribue à la réponse tolérogénique.

1.2.5.3. Perméabilité de la muqueuse dans l'allergie intestinale

L'absorption élevée d'antigènes durant la réaction d'anaphylaxie est établie par plusieurs auteurs (KLEIMAN *et al.*, 1981; TURNER, 1988; PAGANELLI *et al.*, 1990). Cette absorption est due à l'altération des cellules souches épithéliales qui entraîne une atrophie intestinale par nécrose ou une accélération réactionnelle du renouvellement intestinal avec augmentation des cellules à mucus et/ou aplatissement villositaire (VUITTON et SEILLES, 1989). Elle peut également être causée par l'action des médiateurs libérés par la dégranulation des mastocytes muqueux comme l'histamine, sous l'effet d'allergènes alimentaires.

TURNER (1988) rapporte que l'anaphylaxie intestinale induite chez des rats sensibilisés à l'albumine de sérum bovin (ASB) et vérifiée par la libération de la protéase II des mastocytes de rat, est associée à un passage accru de SAB administrée une heure avant. Le rapport des clairances urinaires lactulose/rhamnose augmente également après la pré-administration de ces glucides. Ces observations suggèrent que les réactions d'hypersensibilité intestinale sont associées à l'augmentation de perméabilité aux macromolécules. La même observation est publiée par PATRICK *et al.*, (1988). Cette dernière équipe met en évidence la dégranulation spécifique des mastocytes et le changement ultrastructural de la membrane basale ainsi que de la matrice de collagène de la muqueuse. Chez l'homme, PAGANELLI *et al.*, (1990) rapporte l'augmentation de l'absorption de la β -lactoglobuline chez 3 patients sur 14 ayant un syndrome d'irritation intestinale après apport de lait de vache.

1.2.5.4. Composant alimentaire favorisant la sensibilisation

L'augmentation de l'absorption des substances antigéniques par l'intestin peut être induite par les autres composants alimentaires qui sont potentiellement membranolytiques (qui augmentent la perméabilité gastrointestinale). Ces composants tels que les glycoalcaloïdes et les saponines (RIDAUT *et al.*, 1988) peuvent altérer la perméabilité de la muqueuse ce qui favorise l'absorption des antigènes présents dans le tube digestif.

L'adjonction de substances surajoutées dans un aliment peut être responsable de la réaction allergique, par exemple, les moisissures des fromages et yaourts ou des antibiotiques dans des produits laitiers (PAUPE, 1988b).

Les additifs alimentaires dans les aliments destinés à assurer la coloration, la conservation, la stabilisation ou à renforcer le goût des aliments conduisent à un problème complexe. Ils peuvent provoquer à la fois des réactions d'hypersensibilité, de toxicité et des fausses allergies alimentaires (MONERET-VAUTRIN, 1983).

MATERIEL ET METHODES

II MATERIEL ET METHODES

2.1. PREPARATION DES PROTEINES ET DES HYDROLYSATS

2.1.1. Obtention des caséines entières

Les caséines entières ont été préparées selon la méthode de HAMMARSTEIN (1883) modifiée par NITSCHMANN et LEHMAN (1947).

Le lait de vache frais est centrifugé à 1800 g pendant 20 à 30 min puis mis au froid pendant quelques heures. La couche superficielle de crème est éliminée et le lait est filtré sur coton. Le lait ainsi écrémé est amené à pH 4,6 par HCl 2N sous forte agitation. La caséine "isoélectrique" précipite. Le précipité est recueilli puis lavé dans l'eau distillée. Il est ensuite redissous dans l'eau à pH 7 par addition de NaOH 7N, sous agitation.

Les étapes de précipitation, lavage et redissolution sont répétées trois fois. La solution de caséinate de sodium finalement obtenue est lyophilisée après dialyse de 48 H contre de l'eau distillée.

2.1.2. Extraction des caséines des aliments de souris

Cette extraction a été réalisée pour s'assurer que les aliments vendus "sans caséine" effectivement n'en contenaient pas. Nous avons utilisé 200 g de produit, broyés et agités, pH 7,4 pendant 2 H. Puis le mélange a été centrifugé à 1800 g (Beckman, model J2-21), 25 minutes. A partir des surnageants, nous avons récupéré les protéines par précipitation à pH 4,6. Après dissolution des culots dans 5 ml d'eau à pH 7,4, les protéines sont dosées par le méthode de LOWRY et contrôlées par l'électrophorèse en urée (voir § 2.2.1. et § 2.3.1.1.).

2.1.3. Préparation des hydrolysats enzymatiques de caséine

Nous avons tenté d'imiter le système digestif qui dégrade la caséine dans des conditions limites pour obtenir des fragments peptidiques. Par la suite, nous avons recherché si ces fragments peptidiques avaient des capacités à développer la prolifération lymphocytaire des souris préalablement alimentées en caséine. Nous avons aussi étudié l'absorption intestinale de ces fragments.

2.1.3.1. Les enzymes

Nous avons utilisé la pepsine seule ou l'ensemble trypsine-chymotrypsine. Les enzymes commerciales sont sous forme immobilisées, attachées sur agarose perlé (Sigma Chimie, réf. P 3286, T 1763, C 7260). L'utilisation des enzymes immobilisées nous a permis de récupérer les

hydrolysats sans contamination par les enzymes. Pour la préparation des suspensions enzymatiques nous avons adopté les protocoles proposés par SIGMA.

Dans une fiole à vide, les perles d'enzymes sont lavées et équilibrées dans l'eau pure. Elles sont ensuite suspendues dans HCl 10 mM pour la pepsine et dans l'acide acétique 10 mM pour le mélange de trypsine et chymotrypsine (BERGMEYER, 1983). Ces suspensions sont utilisées immédiatement à raison de 100 µl de concentrations connues pour réaliser l'étude de la cinétique.

2.1.3.2. Protocole d'hydrolyse

Comme substrat pour la pepsine, la caséine a été dissoute dans HCl 60 mM à des concentrations variées. On utilise toujours 2 ml de ces dilutions pour l'étude de la cinétique qui nous a permis de déterminer la concentration optimale de caséine à utiliser.

Fondée sur les résultats des études de cinétique, la solution de caséine à 2 % dans HCl 10 mM a été employée pour la suite des essais. 50 ml de cette solution ont été incubés avec 300 mg de perles de pepsine (69 unités/mg substrat) pendant 2 H. En fin d'incubation on ajoute 4 ml de Tris-HCl 0,5 M pour amener l'hydrolysats pepsique (P) à 0,05 M pH 7,4. Ce qui permet l'inactivation de la pepsine et l'obtention de l'alcalinité optimale pour la trypsine et la chymotrypsine.

La séparation des perles d'agarose qui portent l'enzyme peut être effectuée par centrifugation à 600 g (Beckman, Modèle J2-21), pendant 10 minutes ou par filtration sur papier Whatman à l'aide d'une fiole à vide.

Pour l'obtention d'un hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC) nous avons poursuivi l'hydrolyse à partir de l'hydrolysats pepsique en utilisant le mélange de trypsine-chymotrypsine à raison de 10 unité/mg substrat pour chacune des enzymes pendant 1 heure.

Toutes les hydrolyses sont réalisées dans l'étuve à 37°C munie d'un agitateur (Maton, S.A. 8686050701. Type enceinte climatisée. Agitateur, Maton A 600 ; vitesse 2,5 ; 75 t/min).

2.2. ANALYSES DES PROTEINES ET PEPTIDES

2.2.1. Dosage des protéines

La concentration en protéines a été mesurée par la méthode de LOWRY (LOWRY *et al*, 1951) en utilisant des suspensions diluées 100 et 200 fois dans de l'eau distillée. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine à 96 % de pureté à des concentrations allant de 0 à 100 µg/ml.

2.2.2. Détermination de NH₂ libre

Le degré d'hydrolyse est suivi par la détermination du taux de -NH₂ libérés. Nous avons utilisé la méthode à l'ortho-phtalaldehyde (OPA) proposée par CHURCH *et al.* (1984) et CHURCH *et al.* (1985). Ce réactif réagit en présence de β-mercaptoéthanol avec le groupement -NH₂ des acides aminés libérés durant l'hydrolyse de la protéine. Des courbes d'étalonnage ont été effectuées avec de la lysine et de la caséine pour mettre au point la méthode.

La solution d'OPA (Sigma, réf. P1378) a été préparée en mélangeant les composants suivants : 25 ml de borate de sodium 0,1 M ; 2,5 ml SDS 2-%, 40 mg OPA, 0,1 ml de β-mercaptoéthanol pour 50 ml d'eau distillée. Pour l'analyse de routine, on utilise la courbe étalon de lysine qui est refaite avec chaque série d'essais.

Normalement, 50 µl d'échantillon à tester sont ajoutés directement à 1 ml de solution d'OPA dans les cuvettes du spectrophotomètre. Le mélange est agité par simple renversement, laissé 2 minutes à température ambiante puis l'absorbance est mesurée à 340 nm (Shimadzu, MPS-2000).

2.2.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

2.2.3.1. Principe

La résolution électrophorétique des protéines dans le PAGE dépend de leur charge et de leur poids moléculaire donc du champ électrique appliqué et de la concentration et réticulation du gel.

Les gels sont obtenus par la polymérisation de monomères d'acrylamide et un agent bifonctionnel qui réticule les chaînes polymériques entre elles. Cet agent réticulant est généralement le N-méthylène-bisacrylamide (BIS). Le rapport de concentration acrylamide/BIS est important pour la structure du gel. Pour obtenir un gel élastique et complètement transparent, ce rapport doit être proche de 30.

En général, le rapport de quantité d'acrylamide et Bis utilisées est exprimé en T et C ou :

$$T = \frac{\text{quantité acrylamide (g)} + \text{quantité bis (g)}}{\text{volume final de gel (ml)}} \times 100 \%$$

$$C = \frac{\text{quantité bis (g)}}{\text{Quantité acrylamide (g)} + \text{quantité bis (g)}} \times 100 \%$$

La méthode PAGE peut s'effectuer en présence d'agents dissociants tels que l'urée, SDS et 2-mercaptoéthanol. L'existence d'une forte concentration d'urée dans les gels supprime les liaisons hydrogènes et

hydrophobes. En présence de ce composant, on sépare les protéines par leurs charges (CHRAMBACH, 1985).

Le complexe SDS-protéine a la forme d'une ellipse allongée de petit diamètre constant et dont le grand diamètre est proportionnel à la longueur de la chaîne polypeptidique. Cette liaison dénature la protéine et uniformise sa charge, ce qui permet l'estimation des poids moléculaires de protéines ou de peptides, estimation proportionnelle à la mobilité relative (Rf).

La porosité du gel peut être ajustée en faisant varier les concentrations relatives d'acrylamide et de bisacrylamide. On utilise généralement des concentrations d'acrylamide comprises entre 5 et 15-%. Une concentration plus élevée d'acrylamide ralentit la migration des protéines de poids moléculaires élevés. La séparation des protéines en gradient de densité de polyacrylamide présente l'avantage de réaliser une même séparation de protéines sur une distance de migration plus courte et de retenir des peptides de faible PM (TRIEU-CUOT, 1981).

2.2.3.2. Protocole

Matériel :

Unité d'électrophorèse verticale 2001 et horizontale Multiphor 2117 Cryostat Multitemp II, alimentation macrochive 5 (L.K.B., Bromma, Suède).

Réactifs :

Acrylamide ; N,N'-méthylène bisacrylamide, sodium dodécyl sulfate (B.D.H. Chemicals, Poole, G.B.).

N,N,N,N'-tétraméthyl éthylène diamine (TEMED), persulfate d'ammonium, 2-mercaptoéthanol (Merck, Darmstadt, R.F.A.). Pharmalite (Pharmacia, Upsala, Suède).

Protéines de calibration : myoglobine, Cytochrome C (Serva Fine Biochemicals, Heidelberg RFA).

Colorants Bleu de Coomassie R 250, Bleu de Coomassie G 250 (Serva Fine Biochemicals, Heidelberg, R.F.A.).

2.2.3.2.1. PAGE-Urée

Le système est utilisé avec un gel de 1,5 mm d'épaisseur (T : 8,23 % ; C : 2,8 %) en tampon Tris-HCl 0,38 M pH 8,9, urée 4 M selon la méthode de NG K.H et KROEKER (1984). On dégaze le mélange dans un bain d'ultrason (Bransonic 220, RFA), avant d'ajouter l'initiateur et le catalyseur (TEMED 0,02 % ; persulfate d'ammonium 0,02 %). Les échantillons sont dissous dans le tampon de gel en présence d'urée 4 M.

La migration est effectuée avec un tampon de migration Tris 0,005 M, Glycine 0,07 M pH 8,3 avec un courant de 60 mA, 30 W, 500 V pour une plaque, pendant 2 h 30 environ.

La migration est effectuée avec un tampon de migration Tris 0,005 M, Glycine 0,07 M pH 8,3 avec un courant de 60 mA, 30 W, 500 V pour une plaque, pendant 2 h 30 environ.

Les protéines sont fixées dans une solution de TCA 12 % (P/V) pendant 1 h, puis colorées au Bleu de Coomassie R 250 0,1 % (P/V) dans une solution eau/méthanol/TCA (1/1/2%) pendant 2 h.

Le gel est décoloré dans un mélange eau/méthanol/acide acétique (6,25/3/0,75 V/V).

2.2.3.2.2. PAGE-SDS

Le gel est constitué d'un gel de séparation (T : 15 % ; C :-2,66 % en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 et d'un gel de concentration (T : 4,9 % ; C : 2,66 %) en tampon Tris HCl 0,125 M, pH 6,8. Après dégazage on ajoute les agents réticulants (voir PAGE-Urée) et 0,1 % de SDS.

Nous avons utilisé la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973). Les échantillons à étudier ont été dissous dans du tampon de gel de concentration contenant SDS 1 % et 2-mercaptoéthanol 5 %. Puis le mélange est placé au bain-marie à 100°C pendant 3 min et mélangé volume à volume à la solution comprenant du glycérol 20 % et du Bleu de Bromophénol. Ce colorant permet de visualiser le front de migration. Le tampon de migration est composé de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,9 glycine 0,3 M et SDS 0,1 %. Le courant de séparation, la fixation, la coloration et la décoloration du gel sont identiques à l'électrophorèse PAGE-Urée.

Nous avons utilisé des marqueurs de poids moléculaires pour la calibration du gel. La myoglobine (16950) et ses fragments I + II (14400), I (8160), II (6210) et III (2510), et le cytochrome C (12300) (Serva Fine Biochemicals, Heidelberg R.F.A.).

2.2.3.2.3. PAGE-SDS en gradient de gel

Nous avons utilisé des systèmes à 2 gels, l'un de faible concentration en acrylamide-bis et l'autre de forte concentration pour réaliser des gradients linéaires :

Acrylamide/BIS:

- 16 % / 0,40 % à 28 % / 0,70 %
- 17 % / 0,40 % à 35 % / 0,80 %

La préparation des gels de séparation et de concentration est en principe pareille à celle du gel de PAGE-SDS sauf que 6 % de saccharose sont ajoutés pour stabiliser le gradient. Après réticulation, on ajoute le SDS 0,1 %, les solutions de 16 % et 28 % sont versées dans les compartiments de l'appareil à gradient (XPO77, Hoefer Scientific Instr. USA) pour obtenir le gradient de concentration de 16 à 28 %. L'écoulement entre les 2 plaques se fait à l'aide d'une pompe péristaltique.

de Coomassie R 250, ce qui permet de suivre la densité optique du gel à 660-nm dans une cuve de spectrophotométrie à flux continu (Shimadzu, UV 21000).

2.2.3.2.4. Focalisation Isoélectrique (FIE)

Principe :

C'est une technique de PAGE qui permet la séparation des protéines, peptides ou acides aminés en fonction de leur point isoélectrique (pI). Les molécules, disposées à un point quelconque d'un gradient de pH et soumises à un champ électrique vont migrer soit vers l'anode, soit vers la cathode, selon leurs charges et ne s'arrêteront qu'au point du gradient de pH où leur charge deviendra nulle.

Cette technique est largement appliquée pour la séparation des protéines. Nous tenterons d'utiliser la méthode pour séparer les peptides des hydrolysats de caséines.

Protocole :

Nous avons adopté le protocole décrit par SANOGO (1989) 25 ml d'une solution d'acrylamide (T : 5 % ; C : 5 %) contenant de l'urée 7 M et un mélange de pharmalytes (Pharmacia) 3-10, 2,5-5 ; 4-6 à raison de 2 % (V/V) chacune, est dégazé. Puis, on ajoute 3 μ l de TEMED et 40 μ l de persulfate d'ammonium 10 % (P/V). Le mélange est immédiatement coulé entre deux plaques de verre séparées par un joint de 1 mm d'épaisseur.

Après 1 h de préfocalisation à 0,35 W/cm³ de gel, entre les électrodes de papier imbibés d'éthanolamine 0,66 M (cathode) et de H₂SO₄ 0,36 M (anode), les échantillons sont déposés du côté de l'anode et l'électrophorèse est effectuée pendant 3 heures.

Les gels sont colorés d'après la méthode décrite par GIRARDET *et al.* (1991). Après fixation dans TCA 12 % 3 x 1 h, les gels sont conservés dans cette même solution pendant 20 h. Ensuite les gels sont colorés pendant 5 min dans le colorant d'Andrews (méthanol : TCA = 1:1 ; G 250 0,25 %). Les conditions de décoloration sont les mêmes que celles utilisées pour la technique de PAGE-SDS.

2.2.4. Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (CLHP-phase inverse)

La colonne Lichrospher 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, R.F.A.) adaptée sur un système de CLPH-Phase inverse a été utilisée. Le système comprend l'intégrateur D 2000 et le détecteur L-3000 Photo Diode Array (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Les échantillons lyophilisés sont dissous dans une solution comportant 5 % d'acétonitrile (Prolabo, Paris) et 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA, Pierce). On injecte 3 mg/ml de caséines ou 6-10 mg/ml d'hydrolysats. Le débit appliqué est de 1 ml/min et on réalise un

gradient linéaire en acétonitrile (5 % - 40%), pendant 90 min, suivi d'un lavage à 100% d'acétonitrile pendant 5 min.

2.3. LES ANIMAUX

Nous avons utilisé des souris Swiss ALBINOS âgées de 4 à 6 semaines. Ces souris appartiennent à deux groupes. Le premier, nommé "souris normales" sont des souris élevées chez le fournisseur (Charles River Co., Paris). Dès leur arrivée, ces souris sont mises à un régime sans caséine ni autres produits provenant du lait. Elles sont maintenues à ce régime au moins un mois avant les expériences et pendant toute la durée de l'expérimentation (Alimentation de CRF, UAR, Paris). La composition des aliments est donnée en annexe 1. L'absence de caséine dans ces aliments a été vérifiée (figure 7).

Le deuxième groupe de souris, nommé "souris non-contaminées", sont des souris issues du groupe de souris normales élevées dans notre laboratoire avec un régime sans caséine ou produits dérivés du lait (Alimentation Extralabo, Paris). Un mois après l'arrivage, cinq souris femelles normales sont accouplées avec une souris mâle. Leurs petits sont des souris de première génération non contaminées par la caséine. Ces petits reçoivent par la suite un régime dépourvu de caséine ou de produits provenant du lait bovin. Cependant les souris ont bu le lait de leur mère.

2.3.1. Alimentation et Immunisation

2.3.1.1. Alimentation des souris normales

Six lots de 10 "souris normales" âgées de 2-3 mois ont été utilisés : une fois par jour 4 lots de souris sont gavés avec une suspension de caséine dans l'eau (100 mg/ml/souris) par sonde pendant 2, 4, 6 et 8 semaines (lots 2, 3, 4, 5). Un lot est conservé comme lot de contrôle qui reçoit uniquement de l'eau par sonde (lot 1). Le sixième lot reçoit une suspension de caséine (0,5 ml ; 10 mg/ml) par voie intrapéritonéale, sans adjuvant, deux fois par semaine pendant 3 semaines (lot 6). Cette suspension de caséine a été dialysée contre une solution saline de NaCl à 0,15 M pendant 24 H à 4°C afin de la rendre isotonique ; ensuite, elle a été stérilisée par filtration sur filtre Millipore (Minisart Sartorius 0,22 µm).

2.3.1.2. Alimentation des "souris non contaminées".

Les souris "non contaminées" de première génération, âgées de 3 à 4 semaines sont réparties en 10 cages à raison de 5 souris par cage pour faciliter l'alimentation libre. Chaque expérimentation se fait sur 10 souris, soit 2 cages. Le premier lot (lot 7) sert de lot témoin. Les autres lots (lot 8, 9, 10, 11) sont alimentés respectivement pendant 2, 4, 6 et 8 semaines avec de la caséine (500 mg de caséine mélangée à 2 ml d'eau afin d'obtenir une pâte). La caséine est donnée chaque matin après avoir

mis les souris à jeûn toute la nuit. En général, les souris ont épuisé la pâte en une heure. Les souris sont sacrifiées après 2, 4, 6 et 8 semaines de ce mode d'alimentation.

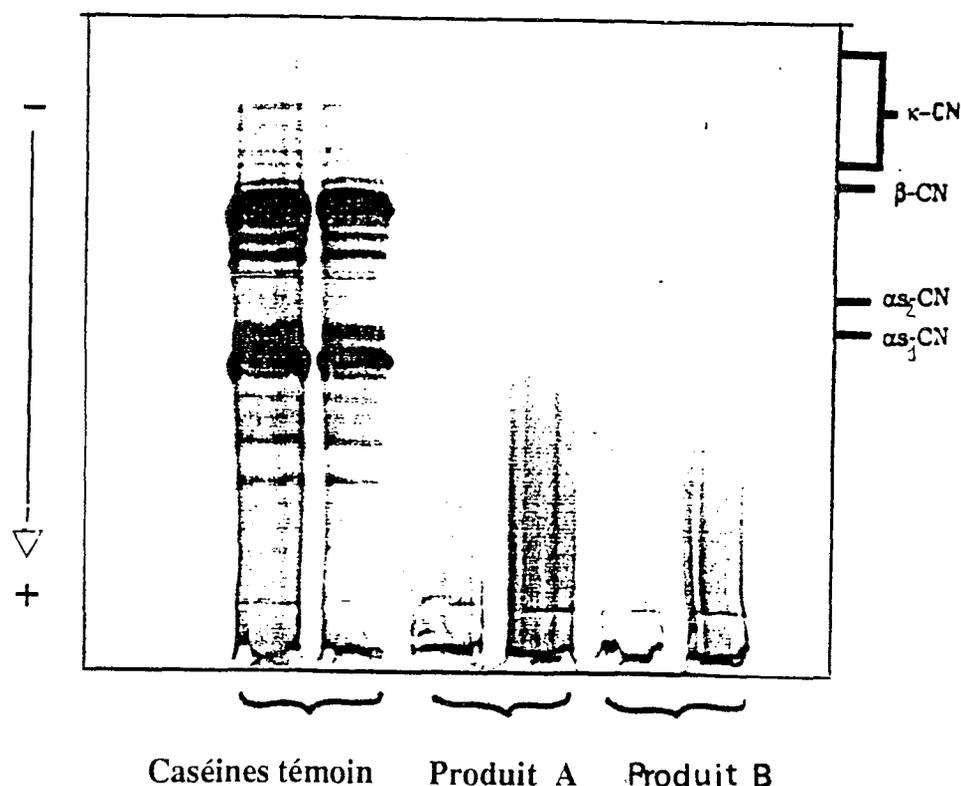


Figure 7. Electrophorèse en urée 4 M des caséines et des protéines extraites des aliments des souris

Deux lots supplémentaires de souris ont été traités. Chez un de ces lots (lot 12), les souris ont reçu de la caséine pendant 10 semaines (500 mg de caséine dans 2 ml d'eau). Pendant les 15 jours suivants, elles sont à nouveau à un régime sans caséine, puis pendant 3 jours elles reçoivent de la caséine, et enfin elles sont soumises à un régime sans caséine. Elles sont ensuite sacrifiées. Dans l'autre lot (lot 13), les souris ont reçu la caséine (500 mg/2 ml eau) pendant 20 semaines, puis les 15 jours suivants, elles sont à nouveau à un régime sans caséine et sacrifiées.

Les différents traitements subis par les souris non contaminées sont résumés ci-dessous :

I. Alimentation en caséine

- Lot 7 : lot contrôle (pas d'apport de caséine)
- Lot 8 : 2 semaines
- Lot 9 : 4 semaines
- Lot 10 : 6 semaines
- Lot 11 : 8 semaines

A la fin de la période d'immunisation, les souris ont été sacrifiées immédiatement après la dernière ingestion.

II. Lots supplémentaires

Lot 12 : alimentation en caséine pendant 12 semaines
mise au repos pendant 16 jours
alimentation en caséine pendant 3 jours
mise au repos pendant 2 jours
sacrifice.

Lot 13 : alimentation en caséine pendant 20 semaines
mise au repos pendant 15 jours
sacrifice

2.4. TEST D'ALLERGENICITE ET D'ANTIGENICITE

Pour explorer la capacité de la caséine à provoquer un état allergique, nous réalisons des tests concernant les lymphocytes et les mastocytes. Ces cellules sont des cellules intervenant dans la réaction allergique. Les lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes B sont les cellules du système immunitaire producteurs d'IgE et IgG. Les mastocytes présents dans de nombreux tissus sont les cellules clés de la réaction allergique.

Si la caséine a un pouvoir allergène, elle devrait être capable d'induire une production d'IgE ou IgG spécifique. Cette capacité est reflétée premièrement par la positivité du test de transformation lymphoblastique (TTL) (la caséine stimulerait les lymphoblastes ce qui indique une reconnaissance antigénique de la caséine par les lymphocytes activés).

Par ailleurs, les IgE spécifiques de la caséine fixées à la surface des mastocytes peuvent provoquer la dégranulation de ces cellules lors d'un deuxième contact *in vitro* avec la caséine. La positivité du test de libération antigénique d'histamine de mastocyte (TLAHM) reflète le pouvoir allergénique de la caséine. Le test cutané rend compte du même phénomène.

Les tests d'antigénicité comprennent des méthodes d'immunoenzymologie et de radioimmunodotting pour la mesure de la production d'anticorps et la détermination d'épitopes. Ce dernier est effectué en utilisant les hydrolysats enzymatiques de la caséine.

2.4.1. Préparation des suspensions cellulaires

A la fin de la période de traitement, les animaux sont sacrifiés par dislocation vertébrale, puis stérilisés à l'alcool et gardés sous une hotte à flux laminaire horizontal (NP 72-classe 100). Toutes les manipulations stériles ont été effectuées sous la hotte. L'air passe en flux à travers un filtre absolu dans l'enceinte de façon laminaire. La taille des particules filtrées est de 0,5 μ avec la vitesse du flux réglée à 0,5 m/sec.

2.4.1.1. Suspension mastocytaire

Pour la préparation de la suspension de mastocytes, nous avons suivi la méthode de BEFUS *et al.* (1982). Aussitôt après la mort des animaux, 5 ml de la solution de Tyrode stérilisée sur microfiltre (Minisart Sartorius 0,2 μ m) sont injectés dans la cavité péritonéale à l'aide d'une petite seringue. Puis le ventre de la souris est massé légèrement pendant 2 minutes et le liquide est aspiré et centrifugé à 150 g pendant 10 min. Les culots sont remis en suspension dans 2 ml de solution de Tyrode - BSA - HEPES, puis les cellules sont comptées en utilisant du Bleu de Toluidine et ajustées à 3×10^5 /ml. Les compositions des tampons utilisés sont données en annexe 2. La figure 8 résume les différentes étapes.

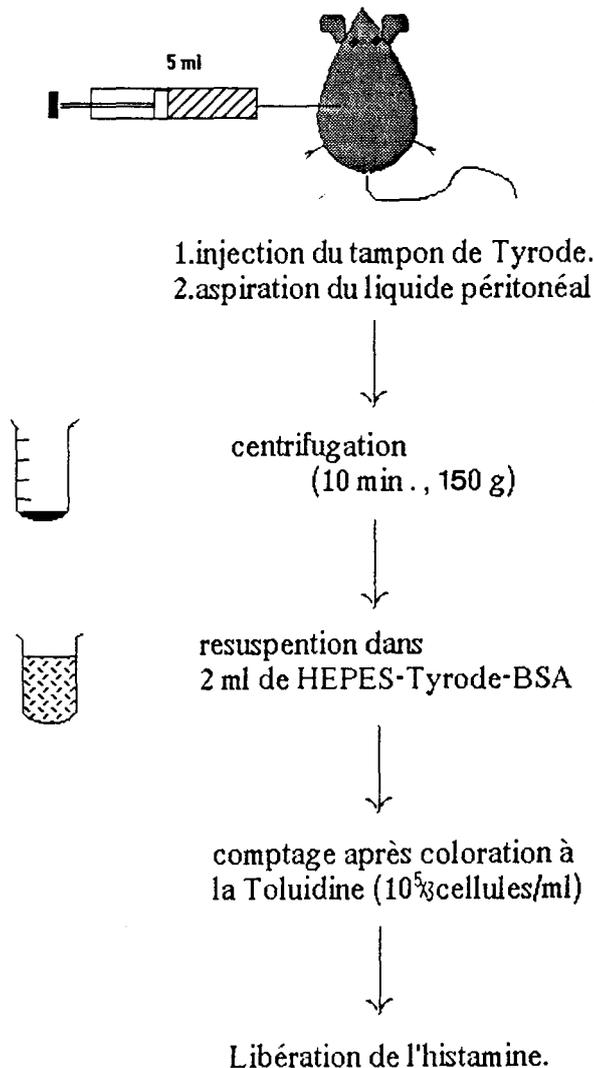


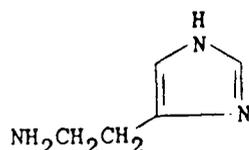
Figure 8. Préparation de la suspension des mastocytes

2.4.1.2. Suspension Lymphocytaire

Après aspiration du liquide péritonéal, on passe à la préparation des lymphocytes. Les rates sont prélevées aseptiquement, broyées à l'aide d'un potier, lavées, centrifugées à 150 g pendant 10 min dans le milieu RPMI 1640 et les culots sont remis en suspension dans le milieu de culture à la concentration de 5×10^6 /ml. 100 μ l de cette suspension sont répartis dans des plaques de 96 puits (Costar réf.3596) pour réaliser le test de transformation lymphoblastique qui sera expliqué ultérieurement.

2.4.2. Test de la libération antigénique d'histamine de mastocytes (TLAHM)

L'histamine dont la structure est donnée ci-dessous est associée aux réactions d'hypersensibilité immédiate dont elle est l'un des principaux médiateurs.



Concentrée dans les granules métachromatiques des mastocytes et des basophiles, elle est spécifiquement libérée à l'extérieur de ces cellules lorsque celles-ci sont mises en présence des allergènes spécifiques auxquels l'individu est sensible. Elle est libérée de manière non spécifique en présence d'anticorps anti IgE ou d'agents pharmacologiques. Ces allergènes spécifiques peuvent être mis en évidence par mesure de l'histamine libérée par les mastocytes sensibilisés *in vivo* après incubation d'une goutte de suspension cellulaire aux allergènes supposés (WEST, 1986; GALLI, 1987; RUFF et SANTAIS, 1988).

2.4.2.1. Incubation des mastocytes

Nous avons suivi la méthode décrite par SIRAGANIAN et HAZARD (1979). La suspension de mastocytes (3×10^5 cellules/ml) de chaque souris est répartie à raison de 300 μ l et on ajoute soit 200 μ l de tampon d'HEPES-Tyrode-ASB (annexe 2) ou 200 μ l de la solution de caséine à la concentration de 25 ou 50 μ g/ml, ce qui donne une concentration finale en allergène de 10 à 20 μ g/ml.

La suspension de mastocytes (environ 3×10^5 /ml) de chaque souris est répartie à raison de 300 μ l dans 4 tubes. On ajoute dans les deux premiers tubes 200 μ l de tampon d'HEPES-Tyrode-ASB. Dans le troisième et quatrième tube, on ajoute successivement 200 μ l de la solution de caséine à la concentration de 25 et 50 μ g/ml ce qui donne une

concentration finale en allergène de 10 à 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ensuite, le premier tube est placé au bain-marie bouillant pendant 10 min pour libérer toute l'histamine des cellules. Le deuxième ainsi que les troisième et quatrième tubes sont incubés au bain-marie à 37°C pendant 10 min. Le deuxième tube représente la libération spontanée d'histamine. La réaction est arrêtée par refroidissement dans un bain de glace pendant 10 min puis les tubes sont centrifugés à 180 g, 15 min. Les surnageants sont conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage de l'histamine. Les différentes opérations sont résumées dans la figure 9.

2.4.2.2. Dosage d'histamine

Pour ce dosage, nous avons utilisé la trousse Immunotech, (Marseille). Le dosage utilise la compétition entre l'histamine acylée et l' ^{125}I -histamine acylée pour un anticorps monoclonal de souris anti-histamine acylée immobilisé sur le tube. L'histamine des échantillons est d'abord transformée rapidement en histamine acylée en milieu légèrement alcalin. Cette transformation est nécessaire pour permettre une bonne reconnaissance de l'histamine par l'anticorps et pour rendre le dosage plus sensible (0,1 nM).

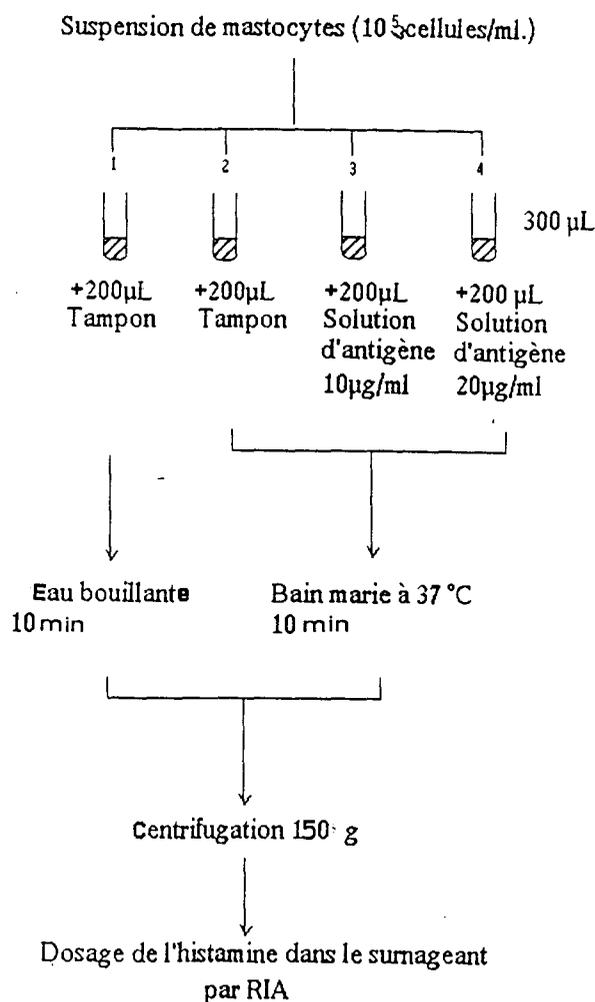


Figure 9. Technique du test de libération antigénique de l'histamine des mastocytes

Mode opératoire

Les échantillons ainsi que les standards sont acylés de la façon suivante : dans les tubes contenant 1 mg de réactif d'acylation lyophilisé, on ajoute 100 μ l de standard (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 15 ; 50 ; 150 nM) ou d'échantillon. Ensuite, on ajoute 50 μ l de tampon borate à pH 8,2 pour acylation ; les tubes sont rebouchés et agités au Vortex immédiatement jusqu'à dissolution complète du réactif.

Après acylation, on ajoute 1 ml de 125 I-histamine acylée d'activité spécifique 4 μ ci/ml en tampon borate 50 mM, pH 8,3 contenant de la sérum albumine bovine. Ensuite, les mélanges sont vortexés et transférés dans les tubes recouverts d'anticorps purifiés anti-histamine.

Dans deux tubes ordinaires sont placés 0,43 ml de 125 I-histamine acylée pour le comptage de la radioactivité totale.

Les tubes sont incubés pendant 18 H à 4°C sans agitation, puis le liquide de chacun des tubes est aspiré et la radioactivité est comptée. Bo est la radioactivité du témoin standard 0, B est la radioactivité de la gamme et des échantillons. La première est établie en utilisant B/Bo et le log de la concentration. Pour se placer au milieu de la courbe standard, nous avons dilué les échantillons de 10 à 50 fois.

2.4.3. Test de transformation lymphoblastique (T.T.L.)

2.4.3.1. Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu RPMI 1640 (Boehringer) en poudre comprenant des acides aminés, des vitamines, des sels minéraux, des bases puriques et pyrimidiques, des ions, du glucose et un tampon (Annexe 3). Il permet d'apporter *in vitro* à la cellule ce qu'elle reçoit habituellement dans son environnement *in vivo*.

Pour prévenir les contaminations, nous ajoutons des antibiotiques au moment de l'utilisation : 100 UI/ml de pénicilline G et 100 μ g/ml de streptomycine de chez Specia.

Le milieu est mis en solution stérilement et il est additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Boehringer 210463-100 ml). Ce sérum contient des protéines et des substances inconnues nécessaires à la croissance des cellules et à leur prolifération. Le pH, la couleur et la limpidité sont garantis ainsi que l'absence de bactéries, de champignons, de virus et des anticorps correspondants, de mycoplasmes et de substances cytotoxiques.

2.4.3.2. L'antigène

C'est de la caséine. Une gamme de caséine à partir de solutions à 0,2 et 0,4 mg/ml dans du RPMI 1640 est réalisée. Les solutions sont stérilisées par filtration sur microfiltre (Minisart Sartorius 0,2 μm) fractionnées en tubes de 5 ml et conservées à -20°C . Au moment de la mise en culture, on décongèle un tube qui ne sera pas réutilisé.

2.4.3.3. La phytohémagglutinine (PHA)

Elle est dissoute dans le milieu de culture sans sérum ni antibiotique. Nous avons essayé plusieurs concentrations de PHA (dilutions 200, 100 et 65 fois) La PHA est un agent mitotique doué de propriétés mitogéniques sur tous les lymphocytes appartenant à un individu dont le potentiel immunitaire est normal. Elle sert comme contrôle positif.

2.4.3.4. La culture

La méthode de culture que nous avons adoptée dérive de celle de ANDERSON *et al*, (1972) et de DUMONT (1974). La figure 10 en résume les différentes étapes. L'ensemble des opérations est effectué stérilement sous la hotte à flux laminaire. La suspension de lymphocytes à la concentration de $5 \times 10^6/\text{ml}$ est répartie à raison de 100 μl par puits. On leur ajoute soit du milieu seul (témoins), soit de la PHA, soit différentes doses d'antigène (caséine). Nous avons préparé une gamme de concentrations de caséine de 50 à 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ culture et une gamme de dilutions de PHA de 65, 100 et 200 fois. Quatre dosages sont effectués pour chaque essai.

Les cultures sont ensuite mises à incuber à 37°C dans une étuve à CO_2 . Au bout de 72 heures, 0,5 μCi de thymidine tritiée (Amersham, réf. TRK 637) sont ajoutés à chaque puits. Les cultures sont arrêtées 24 heures plus tard soit à la 96^{ème} heure. Les cellules sont récoltées par une "cellule harvester" semi-automatique (Titertek Skarton réf. 825 340) et recueillies sur des membranes en fibre de verre. Les cellules sont lavées dix fois avec une solution de NaCl 0,15 M.

Les filtres sont déposés dans les flacons de comptage. Après séchage d'une heure, on ajoute dans chaque flacon 4 ml de solvène (Solvène 350, Packard) et on laisse au moins deux heures à 37°C puis on refroidit à 4°C avant d'ajouter 4 ml de liquide scintillant (Insta-Fluor, Packard). La radioactivité incorporée est mesurée dans un compteur à scintillation liquide réfrigéré (Compteur β , Packard). Tous les résultats sont exprimés directement en coups par minute (CPM).

2.4.3.5. Expression du taux de stimulation

Le degré de stimulation des lymphocytes est quantifié par l'indice de stimulation (IS) c'est-à-dire le rapport entre l'incorporation de ^3H thymidine induite par l'antigène ou mitogène et l'incorporation obtenue par le milieu seul (incorporation basale) :

$$IS = \frac{\text{CPM antigène ou mitogène}}{\text{CPM incorporation basale}}$$

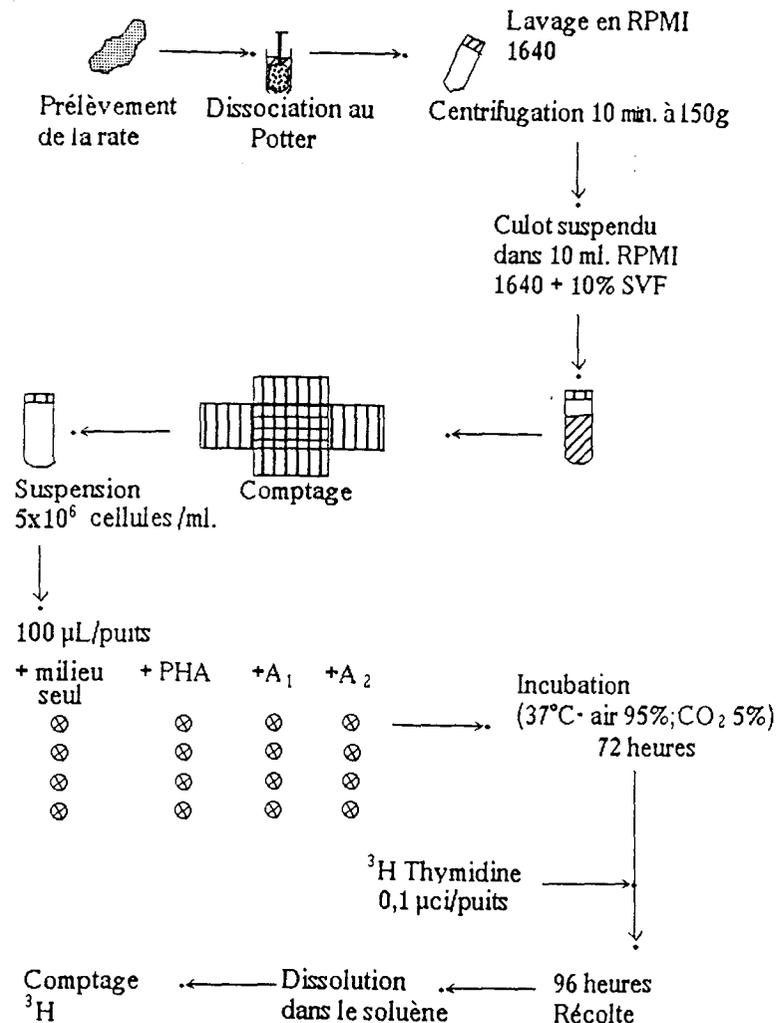


Figure 10. Méthode de culture des lymphocytes

Sauf indication contraire, tous les résultats présentés (figures et tableaux) sont la moyenne + erreur standard de 3 ou 4 puits. En général la dispersion des valeurs oscille entre 10 et 30 %.

2.4.4. Le test cutané

Le test cutané est réalisé chez des souris ayant reçu la caséine par voie intrapéritonéale, des souris contrôles et des souris alimentées en caséine pendant 2 semaines. Le dos des souris est rasé sans blesser la peau. 0,1 ml de la solution de caséine stérilisée par filtration sur microfiltre Millipore (minisart Sartorius, 0,2 µm) et dialysée contre une solution saline de 0,9 % est injectée en intradermique sur le dos rasé. On

injecte dans le derme superficiel 0,1 ml de caséine à 0,5 % jusqu'à l'obtention d'une papule de 2 mm en évitant l'injection d'air et le reflux du liquide lors du retrait de l'aiguille.

La positivité est observée dans les demi-heure, 4 et 24 heures après l'injection. Une injection témoin avec l'eau saline est faite en même temps.

2.4.5. Tests immuno-enzymatiques

Le principe du dosage des antigènes par radio-immunologie a été transposé à l'immuno-enzymologie en remplaçant le marqueur radioactif par un marqueur enzymatique qui est généralement, soit la peroxydase, soit la phosphatase.

L'anticorps ou l'antigène est fixé sur une phase solide, celle-ci étant un immunosupport insoluble dans l'eau et de nature chimique variable (verre, polystyrène, cellulose).

Dans la méthode appelée ELISA, on dose l'enzyme en ajoutant un substrat chromogène et en mesurant la densité optique (DACOSTA, 1984; ENGVALL et PERLMAN, 1971). Plus récemment, une variante de la technique immunoenzymatique, nommée "immunodotting" a été décrite par HAWKES (1982) et STOTT (1989). Dans cette méthode l'antigène est directement adsorbé sur une feuille de nitrocellulose afin de détecter l'activité anticorps de certains sérums contre un assortiment d'antigènes. Après la fixation des antigènes sur les feuilles de nitrocellulose, celles-ci sont incubées dans la solution d'anticorps, lavées, puis révélées à l'aide d'un anticorps marqué par une enzyme.

Cette technique possède plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques immuno-chimiques :

1. Elle est simple à mettre en oeuvre.
2. Des quantités assez élevées de protéines peuvent être fixées sur la membrane grâce à sa grande capacité d'adsorption, ce qui permet de détecter des constituants en faible concentration.
3. La concentration de la réaction colorée en un seul point permet parfois de détecter en "dot" des réponses positives non décelables en ELISA.
4. De faibles volumes d'antigène de l'ordre de 0,5 à 2 µl peuvent être déposés sur la membrane.
5. L'intensité des "dots" peut être quantifiée par la technique de densitométrie.

2.4.5.1. ELISA

Les compositions des tampons utilisés dans les méthodes suivantes sont données en annexe 4.

On fixe sur la plaque en polystyrène de 96 puits soit des Ig anti-Ig de souris (100 µl d'une dilution au 1/1000), soit l'antigène spécifique

(caséine 3 µg/puits ; hydrolysats 4-8 µg/puits) qui sont dissous dans du tampon carbonate de sodium pH 9,6. Après incubation une nuit à 4°C, on rince 3 fois avec du PBS, on sature avec 10 µl de BSA à 2 % dans le PBS, on incube de nouveau une nuit à 4°C et on rince 3 fois avec du PBS-Tween (1/1000). Ensuite, on ajoute 100 µl d'antisérum au surnageant dilué de 10⁻¹ à 10⁻⁴ dans du PBS-Tween. Après 2 h d'incubation à température ambiante, on lave au PBS-Tween 5 fois et on ajoute 100 µl d'anticorps marqué, dilué dans le PBS-Tween (1/1000). Nouvelle incubation de 1 h à 37°C, puis rinçage 5 fois au PBS-Tween, addition de 30 µl de Chromogreen (substrat pour l'anticorps marqué à la phosphatase alcaline avec lecture à 550 nm). Pour l'anticorps marqué à la peroxydase on lave la plaque 1 fois avec le tampon pH 6 et après essorage de la plaque, on ajoute 100 µl de substrat TMB. La réaction est arrêtée avec 25 µl de H₂SO₄ 9N. La lecture des plaques se fait à 450 nm.

2.4.5.2. Immunodotting

Sur une feuille de nitrocellulose, on dessine un quadrillage (carreaux de 1,5 x 1,5 cm) avec un crayon de papier. On rince la membrane à l'eau distillée, puis elle est séchée à l'air libre. On dépose 2 fois 5 µl d'antigène (1 - 5 µg d'antigène dans PBS) au centre des carreaux en utilisant un sèche-cheveux pour limiter la diffusion du liquide. Après séchage la feuille peut être conservée à température ambiante. Toutes les étapes suivantes se font en utilisant 20 ml de chaque solution et à température ambiante. Les compositions des tampons sont données en annexe-4.

La saturation du filtre est réalisée en 30 minutes dans du PBS-BSA 3% suivi par 3 rinçages dans le PBS et par une incubation dans la solution d'anticorps diluée 250 fois avec du PBS. Après 1 h d'incubation la membrane est lavée 3 fois 5 minutes dans le PBS, 1 fois dans le PBS-BSA 3 %, puis placée dans la solution de PBS contenant l'anticorps conjugué à la phosphatase-alcaline diluée au 1/5000 pendant 1 h. Ensuite, la membrane est lavée 3 fois 5 minutes au PBS-Tween puis révélée avec 5 ml de solution contenant le substrat (chromogreen) et placée au-dessus de la feuille. La révélation observée visuellement est arrêtée par plusieurs lavages dans l'eau distillée tout de suite après l'apparition de la couleur.

2.4.5.3. Radioimmunodotting

C'est une technique basée sur le même principe que l'immunodotting : l'antigène marqué est déposé sur l'anticorps préalablement fixé à la membrane. Nous avons développé cette technique à partir de la méthode utilisée par LITTAUER *et al.* (1986) pour déterminer le site de fixation d'une protéine. On prépare le matériel, les réactifs et les techniques de fixation de la même façon que pour l'immunodotting.

Au centre du carreau de la membrane de nitrocellulose on fixe l'anticorps (1/100 à 1/1000) puis on sature les sites spécifiques et on

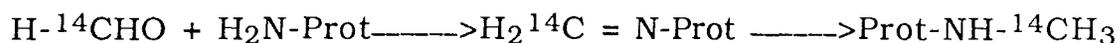
fait des rinçages. On incube les morceaux de membranes avec 0,5 ml d'antigène (caséine) marqués au ^{14}C . Dans cette étape on utilise des plaques de culture de 24 puits que l'on referme pour éviter l'évaporation.

Après incubation d'une heure, on lave les morceaux de nitrocellulose 6 fois 5 minutes, on sèche à l'air et on les met dans les tubes de comptage. On compte la radioactivité en utilisant le liquide scintillant (Insta Fluor, Packard) dans le compteur β (β compteur, Packard).

2.5. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE

2.5.1. Marquage de la caséine en ^{14}C

Principes : Le marquage de la caséine par la formaldéhyde radioactive ($\text{H-}^{14}\text{CHO}$) est fondé sur la formation d'une base de Schiff entre le groupement carbonyle du $\text{H-}^{14}\text{CHO}$ et les groupements NH_2 libres de la lysine. Par une réduction du borohydrure de sodium, la réaction forme le dérivé N-alkyle.



Protocole : On utilise la méthode décrite par ABOU-GHORRAH (1987). A la solution de caséine entière à 1 % en tampon borate de sodium 0,1 M pH 9, on ajoute du formaldéhyde radioactif marqué au ^{14}C (Amersham, activité spécifique = 36 mCi/mM) à raison de 1 mCurie par gramme de protéine. Le formol est prélevé à l'aide d'une seringue aussitôt après décongélation du produit. On ajoute ensuite 450 μl de borohydrure de potassium à 88,3 mM maintenu à 0°C sous légère agitation. Puis le mélange est dialysé pendant 5-6 jours contre l'eau distillée avec un débit de 100 ml/h pour éliminer l'excès de formaldéhyde. Enfin, on répartit le mélange dans des tubes de 5 ml à raison de 3 ml par tube qui sont conservés à -20°C . Cette caséine marquée a été préparée par Madame GUIMONT (Laboratoire de Biochimie Appliquée).

Pour tester l'activité spécifique de la caséine marquée, 50 μl de solution sont déposés sur une rondelle de papier Whatman 3 MM qui est plongée dans une solution de TCA 12 %. La radioactivité acido-précipitable (TCA) est mesurée par scintillation liquide.

2.5.2. Préparation des sacs intestinaux

Cette manipulation se fait sur l'intestin retourné des souris selon la méthode décrite par NABET (1961). Dans cette technique la face mucosale est exposée à l'extérieur, l'absorption est effectuée *in vitro* dans des conditions closes et limitées. La viabilité du tissu dans ce système est courte (au maximum 1 heure) mais grâce à sa simplicité et sa bonne reproductibilité, il est souvent utilisé pour l'étude de l'absorption trans-épithéliale (BUDDINGTON et DIAMOND, 1989; CARLIER *et al.*, 1989).

Nous avons utilisé des souris Swiss femelles, "normales", âgées de 3 à 4 semaines. Elles sont arrivées au laboratoire âgées de 2 semaines et ont reçu le régime des souris normales. Elles sont sacrifiées par dislocation vertébrale. Tout de suite après la mort de la souris, l'animal est rincé à l'alcool et opéré. On prélève environ 25 cm d'intestin, de 10 cm d'estomac à 1 cm du *caecum*. On place ensuite le prélèvement dans une boîte de Pétri remplie de solution KREBS-HENSELEIT (K-H, annexe 5) et l'on travaillera dorénavant l'organe immergé dans ce liquide, en évitant le plus possible les manipulations afin de ne pas abîmer la muqueuse.

L'intestin est ensuite coupé en deux, la partie voisine du *caecum* étant l'iléon et celle voisine de l'estomac étant le jéjunum (SAID *et al*, 1985). On procède à un lavage par perfusion lente avec 20 ml de tampon (K.H.). Puis l'anse intestinale est retournée sur elle-même à l'aide d'une baguette de verre d'un diamètre d'environ 2 mm arrondie à son extrémité. Pour cela, on embroche le morceau d'intestin sur la baguette et on fait coulisser en la manipulant doucement. La muqueuse se trouve alors vers l'extérieur. L'iléon et le *caecum* sont coupés en deux parties égales qui serviront à faire les sacs. On ligature l'une des extrémités d'un morceau d'intestin à l'aide de fil de lin. A l'autre extrémité, on ligature sur une aiguille à pointe mousse pour ne pas léser le tissu, et on branche sur une seringue contenant la solution de K-H supplémentée en glucose et glutamine 0,6 mM. Cette solution est injectée pour avoir un boudin encore flasque d'environ 3-4 cm de long.

En général, on injecte 200-300 μ l de solution. On laisse une petite bulle d'air emprisonnée dans le boudin pour assurer un minimum d'oxygénation. L'aiguille est ensuite retirée doucement en resserrant le noeud. On aura ainsi confectionné deux sacs jéjunum et deux sacs d'iléon.

2.5.3. Incubation

Immédiatement après la confection, les sacs sont placés dans des fioles à incubation contenant 10 ml de liquide d'incubation, composée de la solution de K-H qui contient du glucose 1 mM et de la glutamine 0,6 mM (K-H complétée) et les produits à tester: ^{14}C -caséine (activité: cpm/mg poids sec) et ses hydrolysats pepsique (^{14}C -P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (^{14}C -PTC). Ces hydrolysats ont été préparés selon la méthode décrite dans le §2.1.3.2

Les liquides d'incubation sont préparés selon les objectifs des manipulations.

- le test de viabilité du tissu : 10 ml de solution K-H complétée + 30- μ l de ^{14}C -PEG 4000.
- les témoins : 10 ml de solution K-H complétée
- l'effet de la caséine sur la perméabilité : 9 ml de solution K-H complétée + 1 ml de caséine à 1 % + 30 μ l de ^{14}C -PEG 4000.
- absorption des produits marqués : 9 ml de solution K-H complétée + 1 ml de produit à 1 % (^{14}C -caséine, ^{14}C -P, ^{14}C -PTC).

Les fioles à incubation sont des Erlens de 50 ml avec rodage normalisé. Le gavage des fioles se fait par le bouchon rodé qui laisse passer deux

tubules. Ceux-ci sont fermés à l'aide de caoutchouc sur lesquels sont fixées des pinces de Mohr. On gaze les fioles pendant 30 sec avec le mélange de O₂ 95 % et CO₂ 5 %. On procède ensuite à l'incubation des fioles contenant donc deux sacs intestinaux dans un bain-marie à 37°C muni d'un agitateur (80 oscillations par min.) pendant 0, 10, 15, 30, ou 60 min.

En fin d'incubation, les sacs intestinaux sont lavés 3 fois dans l'eau distillée et séchés sur une feuille de papier blanc. Les liquides intérieurs sont prélevés à l'aide d'une aiguille fine et transvasés dans des tubes de 3 ml. Ensuite, on élimine les deux ligatures, on incise les sacs et on les lave plusieurs fois dans l'eau distillée pour éliminer la contamination par les liquides d'incubation. Puis les tissus sont pesés et dissous dans 0,5 ml de soluène pendant une nuit. Après addition de 4,5 ml de liquide scintillant, la radioactivité est comptée. La radioactivité du liquide intérieur est mesurée sur une partie aliquote de 50 µl de liquide mélangé avec 0,5 ml de soluène. Après une heure d'attente, on ajoute 4,5 ml de liquide scintillant et on compte.

2.5.4. Histologie

En général, la préparation histologique comprend différentes étapes-: la fixation, la déshydratation, l'inclusion, la coupe, l'étalement, le déparaffinage, la coloration. L'étape de déparaffinage précède la coloration. Elle permet de réhydrater le tissu et suit donc, en les inversant les principales étapes de l'inclusion.

Mode opératoire :

Les préparations histologiques sont réalisées par Mme HATIER (Laboratoire d'histologie, Professeur GRIGNON). La fixation des fragments intestinaux a été faite dans 4 ml de solution de Bouin - Hollande - sublimé pendant 2 j, puis ces fragments sont soumis à trois bains de 6 h dans l'alcool à 70°, puis à trois bains de 6 h dans l'alcool à 100°C, suivis d'un bain de Toluène de 40 min avant imprégnation dans la paraffine liquide pendant 2-3 j à 56°.

L'inclusion se fait dans des Barres de Leukart pour la mise en bloc des tissus. Les blocs sont coupés au microtome (5 µm d'épaisseur), ensuite les coupes isolées sont étalées sur les lames en utilisant de l'eau albumineuse. Pour le déparaffinage, les coupes sont traitées dans trois bains successifs de 10 min dans le toluène et réhydratés dans l'alcool de 100° à 70°. Avant lavage à l'eau, les lames sont décolorées dans la solution d'hyposulfite 10 %.

La coloration est réalisée par la méthode au Trichrome de Masson modifiée. Pour la coloration des noyaux, du cytoplasme et des fibres collagènes on utilise successivement les colorants d'hématoxyline (10 min), Fuchsine - Ponceau (quelques secondes) et vert lumière (10 min). Après rinçage, les coupes sont déshydratées et montées avec du Baume du Canada. Toutes les compositions des solutions utilisées sont présentées en annexe 6.

2.5.5. Autoradiographie

Cette technique est basée sur la capacité des radiations ionisantes à impressionner les émulsions photographiques. Après électrophorèse des protéines marquées, le gel d'acrylamide est mis en contact avec l'émulsion photographique.

Pour avoir une bonne image, il est nécessaire de mettre en contact le gel et l'émulsion photographique pendant un temps d'autant plus long que les doses de radioactivité sont plus faibles. Ces inconvénients peuvent être réduits par l'utilisation d'une solution fluorographique qui est capable de transformer l'énergie émise par le radioisotope en énergie lumineuse.

Après décoloration et séchage des gels d'électrophorèse ces derniers sont pulvérisés avec une solution fluorographique (Fluorography Amplifier Reagents, Spray, Amersham). Le gel est ensuite mis en contact avec un film autoradiographique (Hyperfilm β -max, Amersham) et maintenu à -80°C dans une cassette pendant un temps variable dépendant de la radioactivité déposées sur le gel.

2.5.6. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est un procédé de séparation des molécules qui utilise une membrane à perméabilité sélective. Nous avons séparé les peptides issus de la ^{14}C -caséine, de ^{14}C -hydrolysate P et ^{14}C -hydrolysate PTC absorbés par l'intestin dans des tubes d'ultrafiltration de 2,5 ml (Centricon, microconcentrators, Amicon, USA) à zone de coupure de 30 000, 10 000 et 3 000 Daltons. Cette séparation est réalisée sous forte gravitation (7500 g) dans un centrifugeuse (Beckman Model J2 - J21).

On arrête l'ultrafiltration quand les volumes de l'ultrafiltrat et du rétentat représentent $2/3$ et $1/3$ du volume initial. Le rétentat (R) est lavé trois fois ; pour cela il est ramené chaque fois à son volume initial avec l'eau distillée et ultrafiltré à nouveau dans les conditions décrites ci-dessus. Ultrafiltrat et rétentat obtenus sont congelés à -80°C .

Les ultrafiltrats et les rétentats sont analysés pour déterminer la taille moléculaire des fragments qui sont absorbés par l'intestin. De plus, on utilise les ultrafiltrats pour déterminer l'antigénicité des molécules qu'il contient en utilisant la méthode de radioimmunodotting (voir matériel et méthodes). Dans ce cas, la membrane intestinale fonctionne comme un filtre biologique qui sélectionne les molécules qui portent les épitopes.

Pour la détermination du poids moléculaire, on ajoute à 10 μl de chaque ultrafiltrat, 0,4 ml de solution solubilisant de tissu (Soluène 350 Packard). Après une heure, on ajoute 4 ml de liquide scintillant (Insta-Fluor, Packard) à 4°C . La radioactivité est mesurée dans le compteur à scintillation liquide (B-compteur, Packard). Les résultats exprimés directement en coups par minute (CPM) représentent les molécules filtrées en fonction des zones de coupure des membranes d'ultrafiltration.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE LYMPHOCYTES ET DES CONDITIONS D'INCUBATION DES MASTOCYTES

Le but de ces manipulations est d'obtenir des conditions optimales pour la culture de lymphocytes et l'incubation des mastocytes de souris recevant de la caséine à raison de 100 mg/jour. Ces deux systèmes cellulaires servent à réaliser le test de transformation lymphoblastique (T.T.L.) et le test de la libération antigénique de l'histamine des mastocytes (T.L.A.H.M.).

Dans la littérature, de nombreux articles décrivent l'emploi du T.T.L. et du T.L.A.H.M. dans le cadre du diagnostic des allergies. Ils utilisent principalement les cellules périphériques du sang des malades mais nous n'avons pas trouvé d'article concernant l'utilisation du T.L.A.H.M. vis-à-vis de la caséine.

La définition du mastocyte acceptée généralement est fondée sur la métachromatie de ses granules en présence de colorants à base de thiazine. La toluidine est le colorant le plus utilisé. La métachromatie résulte des réactions de cette dernière avec des glycosylaminoglycannes des cellules (ENERBACK, 1966). Les mastocytes deviennent rouges brillants, ce qui facilite leur identification et leur dénombrement.

Dans nos conditions expérimentales, nous pouvons prélever 2 à 8.10^4 mastocytes par souris. Les cellules péritonéales contiennent en fait un mélange de macrophages (30 à 40 %), de lymphocytes (20 à 70 %), d'érythrocytes et de mastocytes (3-10 %) (NEMETH et ROHLICH, 1980; CANDUSSIO *et al.*, 1987; THEOBALD *et al.*, 1987). La concentration en mastocytes obtenue est proche de celle rapportée par SIRAGANIAN et HAZARD (1979) qui leur a permis de récupérer environ $1,4 \times 10^5$ cellules par souris.

Pour la préparation de cellules lymphocytaires, nous avons pu recueillir de 10^7 à 10^8 cellules nucléées à partir d'une souris. Ceci est en accord avec ce qui est rapporté par DUMONT (1974). En coloration par le Bleu Trypan, on montre qu'environ 99 % des cellules sont vivantes dans les deux types de suspension cellulaire.

3.1.1. Effet de la dose de PHA

Avant de faire des T.T.L., la dose optimale de PHA à employer pour la stimulation des lymphocytes a été déterminée. Les lymphocytes provenant de souris "normales" (n'ayant pas reçu de caséine) ont été cultivées pendant trois jours en présence de doses croissantes de PHA.

La courbe d'incorporation de ^3H -Thymidine, en présence de concentrations croissantes de PHA est grossièrement linéaire (figure 11).

La concentration optimale se situant autour de la dilution au 1/100 (les cpm de PHA sont 12 fois plus importants que ceux du témoin). Nous avons donc adopté cette concentration dans toutes nos expériences. Dans ces conditions, les cpm des témoins se trouvent autour de 3000 à 4 000, leur coefficient de variation étant de 7 à 11 %.

3.1.2. Cinétique des réponses à différentes concentrations de caséine

Cette expérience a été menée sur 4 souris alimentées en caséine à raison de 100 mg par jour, à l'aide d'une sonde et cela pendant 2 semaines. Comme le montre la figure 12, la réponse des lymphocytes à la caséine est plus élevée au 4^{ème} jour de culture. La gamme des doses efficaces de caséine est plus variable que celle obtenue avec la PHA. Nous avons constaté que le niveau maximal de stimulation lymphoblastique et la concentration optimale de la caséine pouvaient varier d'une souris à l'autre.

Compte-tenu du fait que les résultats ne sont pas significativement différents que l'on utilise 50 ou 200 µg/ml de caséine, dans la suite des expériences nous avons choisi de travailler avec 2 doses de caséines : 50 et 100 µg/ml.

Sur la figure 12 est reportée également la cinétique de la PHA. La stimulation la plus forte se situe au 3^{ème} jour. Après le 4^{ème} jour, il y a une chute de la stimulation lymphoblastique, soit à la PHA soit, aux caséines.

Cependant, pour les cellules cultivées en milieu seul (témoin), représentant l'incorporation basale de ³H-Thymidine, les résultats sont identiques jusqu'au 5^{ème} jour de culture. Ceci démontre que les cellules restent viables pendant cette période de culture de 5 jours.

3.1.3. Effet de la dose de caséine sur la libération d'histamine par les mastocytes

Cette manipulation a été effectuée sur des souris recevant de la caséine pendant 2 semaines. Nous avons testé une gamme de concentrations de caséine variant de 10 à 100 µg/ml en présence de mastocytes.

Les résultats de la figure 13 nous font apparaître qu'à partir de 20-µg/ml de caséine, il y a une très faible libération d'histamine qui n'est pas significative. Dans la suite des expériences, nous avons donc utilisé deux concentrations de caséine 10 et 20 µg/ml.

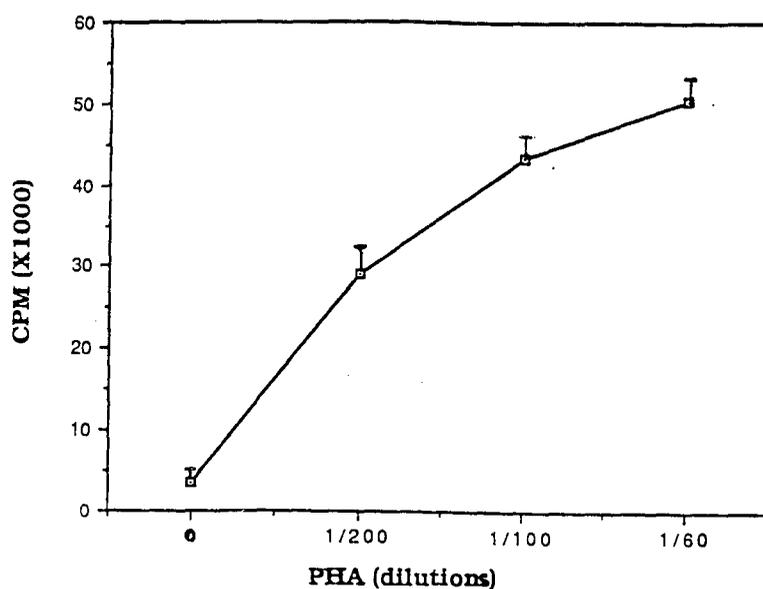


Figure 11. Réponse lymphoblastique selon les différentes dilutions de PHA.

Les lymphocytes proviennent de souris ayant reçues des caséines pendant 2 semaines. Chaque point représente 24 réplifications réalisées à partir de lymphocytes provenant de 3 souris.

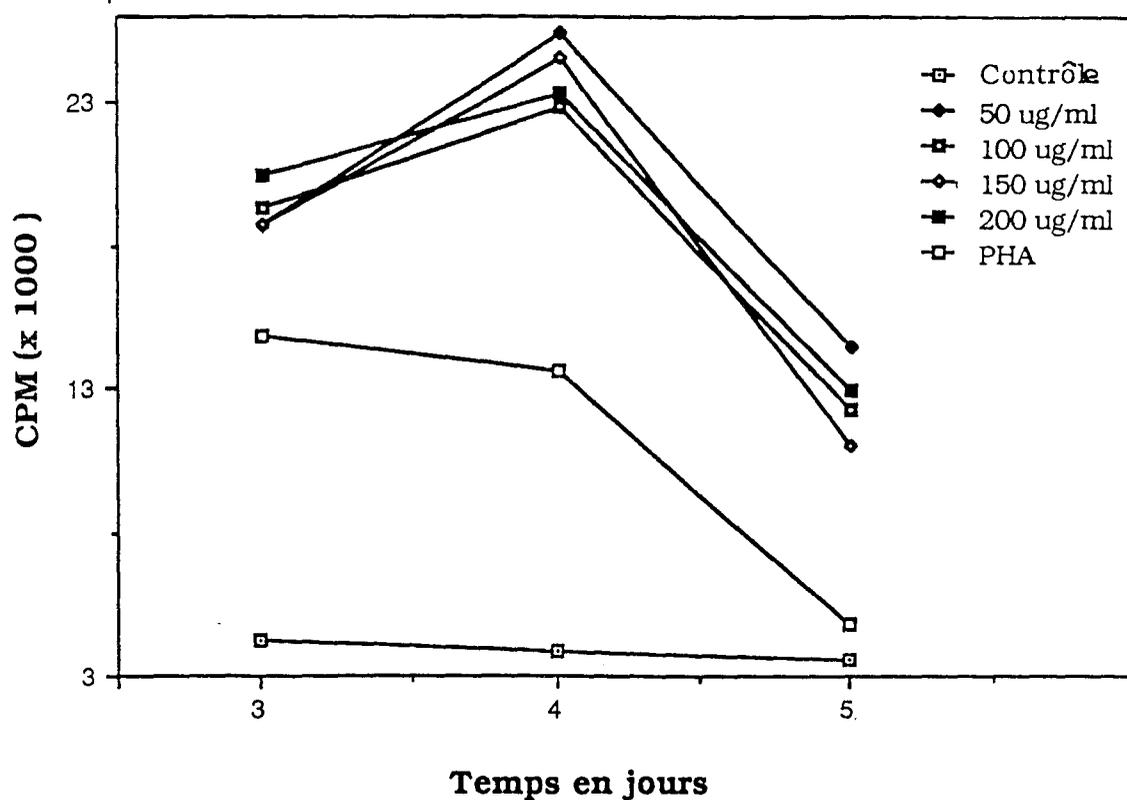


Figure 12. Cinétique des réponses à différentes concentrations de caséine.

Les lymphocytes proviennent de souris ayant reçu des caséines (100mg/jour) pendant 2 semaines. Chaque point représente 16 réplifications réalisées à partir de lymphocytes provenant de 4 souris. Les coefficients de variations vont de 7 à 15%.

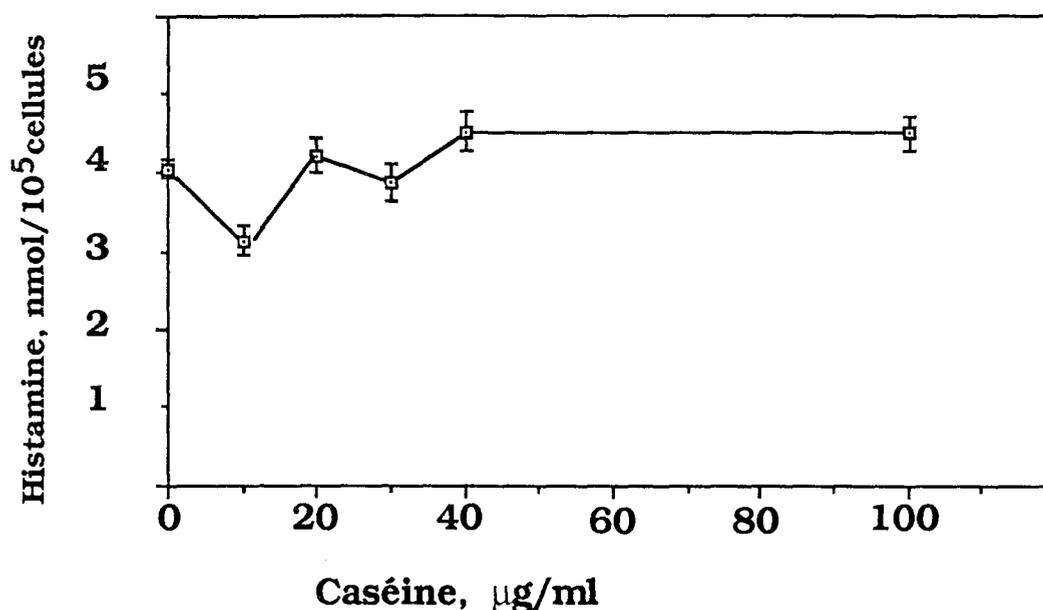


Figure 13. Courbe dose-réponse de la libération d'histamine des mastocytes en présence de quantités croissantes de caséine.
 Les mastocytes ont été prélevés chez des souris "normales" ayant reçu 100 mg de caséine par jour pendant 2 semaines. Chaque point représente 8 réplifications.

3.1.4. Discussion

3.1.4.1. La dose optimale de PHA

Certains auteurs utilisent différentes doses de PHA pour stimuler les lymphocytes de souris (BURGER *et al.*, 1983; HORNICEK *et al.*, 1986) ceci à cause des propriétés différentes des PHA d'origine variée. En général, on utilise des dilutions variant de 1/20 à 1/200 selon la pureté, ou une gamme de concentration de 5 à 20 ng/ml selon le pouvoir mitogénique des produits.

La PHA est une mucoprotéine (lectine) possédant des propriétés agglutinantes détruites par la chaleur (80°C) et blastogéniques (thermostables). Les procédés d'extraction variés de cette substance aboutissent à des produits dont les capacités mitogéniques ne sont pas identiques. Comme le préconise la Société DIFCO, dans nos expériences nous avons utilisé différentes dilutions.

3.1.4.2. Le temps de culture optimal

Le PHA étant un agent mitotique, son utilisation comme témoin positif est indispensable pour le contrôle des conditions de culture et pour tester le potentiel immunitaire des cellules. En présence de cette substance, les petits lymphocytes de 6 à 8 μ de diamètre se

transforment en une grande cellule de volume triple ou quintuple, en une vingtaine d'heures.

Cette augmentation de taille porte surtout sur le cytoplasme puisque le rapport nucléocytoplasmique passe de 0,3 à 0,7 (WOLFROMM, 1972). Ceci correspond à la stimulation lymphoblastique qui est maximale au troisième jour en présence de PHA dans notre expérience (figure 12) et ailleurs (WOLFROMM, 1972).

Le temps de culture optimal des lymphocytes en présence de PHA et des antigènes est indépendant. Il faut 2 à 4 jours d'incubation avec un agent mitogène aspécifique, comme la PHA, pour avoir la synthèse optimale du DNA (JANOT *et al.*, 1970). En présence d'un antigène spécifique cette réponse optimale se situe entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour. De plus, le temps étant différent, il doit être déterminé pour chaque antigène.

Dans nos expériences, nous avons trouvé un temps d'incubation optimal en présence de PHA de trois jours. Compte tenu de ce résultat, nous avons décidé de faire varier le temps de culture en présence de caséine (stimulation spécifique) entre 3 et 5 jours. Les résultats montrent qu'en présence de caséine, le temps optimal est de 4 jours.

3.1.4.3. La concentration optimale de caséine

Dans ces expériences, nous avons noté que la dose optimale de caséine était de 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 12). L'utilisation de la caséine dans le T.T.L. avec des lymphocytes provenant de souris n'a pas à notre connaissance été citée dans la littérature. Une équipe de chercheurs a publié des travaux sur des lymphocytes de rats avec de l'albumine comme antigène spécifique (DRUGUET et ANDREW, 1975). Plus récemment, deux autres équipes (GREGORY *et al.*, 1985; ALBANI *et al.*, 1989) ont rapporté que les concentrations optimales de caséine étaient respectivement de 100 à 250 $\mu\text{g/ml}$ et 160 $\mu\text{g/ml}$. Ces derniers ont employé les lymphocytes du sang de patients présentant une allergie au lait. Les résultats de nos expériences sont donc en accord avec ces publications.

3.1.4.4. La dose optimale de caséine dans le test de libération antigénique d'histamine des mastocytes (TLAHM)

Plusieurs types d'agents stimulants ont été utilisés pour induire la libération d'histamine : un composant non-antigénique 48-80 a été utilisé à la concentration de 0,05 à 1 $\mu\text{g/ml}$ (ATKINSON *et al.*, 1979) tandis que d'autres composants antigéniques tels que l'anti IgE, le KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) et l'albumine d'oeuf ont été employés respectivement à des concentrations de 100 $\mu\text{g/ml}$ (BLASZCZYK *et al.*, 1980) et 20 $\mu\text{g/ml}$ (TASAKA *et al.*, 1986).

D'après cette gamme de concentration des produits, nous avons décidé d'utiliser des concentrations de caséine variant entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$. Nos résultats semblent démontrer que les doses optimales sont comprises entre 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$ ce qui correspondrait aux concentrations de l'albumine de l'oeuf.

Néanmoins, les taux d'histamine libérée qui restent inchangés en fonction de la dose de caséine laissent supposer l'absence de complexes caséine anticorps IgE anti-caséine au niveau de la membrane des mastocytes.

3.2. TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE DES CELLULES DE SOURIS "NORMALES" RECEVANT 100 mg DE CASEINE PAR JOUR.

Le but de cette manipulation est de vérifier si les lymphocytes ont été sensibilisés *in vivo* à la caséine. Les souris "normales" (élevées chez le fournisseur) âgées de 6 semaines sont nourries avec des aliments sans caséine un mois avant et pendant toute la période des expériences. L'absence de caséine dans la nourriture a été préalablement contrôlée (figure 7). Après un mois de régime sans caséine les animaux sont gavés en caséine à raison de 100 mg/jour afin de les sensibiliser par voie orale. Ces gavages sont effectués pendant 2, 4, 6, et 8 semaines (voir matériel et méthodes, § 2.3.1.). Les différentes étapes avant la récupération des lymphocytes sont résumées dans la figure 14.

Lot	1	2	3	4	5	6
Nombre de souris	12	10	10	10	10	6
Période d'ingestion de caséine 100 mg/j (en semaines)	0	2	4	6	8	IP

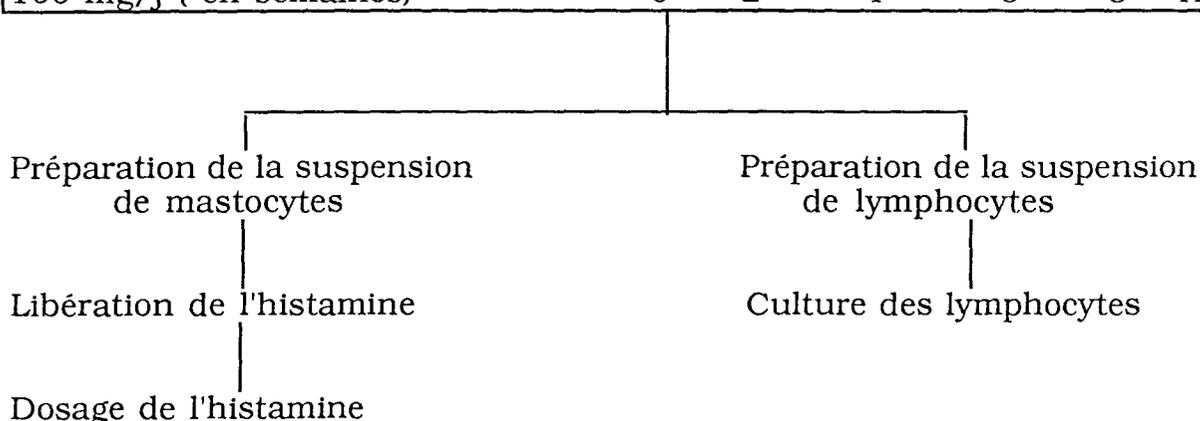


Figure 14. Etapes précédant les tests de transformation lymphoblastique (TTL) ou les tests de libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM)

IP : Immunisation par voie intrapéritonéale

Les résultats concernant l'incorporation de ^3H -Thymidine dans les cellules de chaque lot de souris sont présentés dans les tableaux 10, 11, 12, 13 et 14. Compte-tenu de la grande dispersion des résultats pour pouvoir les comparer entre eux, nous avons calculé les indices de stimulation lymphoblastique (rapport des cpm dans les cellules cultivées en présence de caséine sur cpm du milieu seul). Les résultats sont présentés dans la figure 15.

Tableau 10, 11, 12 . Incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes de souris n'ayant pas reçu de caséine (contrôles) (Tableau 10) , de souris recevant 100 mg/jour de caséine pendant 2 semaines (Tableau 11) et de souris recevant 100 mg/jour de caséine pendant 4 semaines (Tableau 12). Les cellules sont cultivées en présence de PHA ou de caséine . Les résultats sont de moyenne de 4 replications.

Tableau 10

souris	milieu seul	P.H.A (1/100)	caséine 50 μg	caséine 100 μg
1	210 \pm 110	4640 \pm 1876	2954 \pm 867	2461 \pm 910
2	2036 \pm 215	6611 \pm 1042	8875 \pm 3538	10583 \pm 907
3	2586 \pm 801	11736 \pm 1400	12576 \pm 2775	18705 \pm 3829
4	4736 \pm 487	11932 \pm 1346	20189 \pm 2147	23242 \pm 865
5	12401 \pm 941	10701 \pm 930	27358 \pm 948	24176 \pm 1332
6	518 \pm 86	10734 \pm 2391	10537 \pm 1548	13467 \pm 1910
7	105 \pm 20	1033 \pm 179	1025 \pm 203	592 \pm 76
8	138 \pm 12	2294 \pm 461	101 \pm 2	72 \pm 8

Tableau 11

souris	milieu seul	P.H.A (1/100)	caséine 50 μg	caséine 100 μg
1	5503 \pm 923	10600 \pm 759	15262 \pm 3289	12415 \pm 2617
2	8822 \pm 816	9233 \pm 1061	18832 \pm 4217	17632 \pm 772
3	3791 \pm 344	22865 \pm 1918	26522 \pm 3153	23064 \pm 2224
4	14536 \pm 2549	23548 \pm 3776	35059 \pm 1641	32876 \pm 1864
5	970 \pm 133	5724 \pm 1085	5581 \pm 777	10729 \pm 2030
6	1209 \pm 173	5956 \pm 1293	3537 \pm 281	3924 \pm 320
7	85 \pm 10	325 \pm 49	281 \pm 52	268 \pm 21
8	65 \pm 5	812 \pm 29	1159 \pm 49	822 \pm 224

Tableau 12

souris	milieu seul	P.H.A (1/100)	caséine 50 μg	caséine.100 μg
1	616 \pm 184	1606 \pm 297	524 \pm 165	187 \pm 44
2	2881 \pm 546	8145 \pm 1485	3685 \pm 618+	1045 \pm 224
3	343 \pm 86	2653 \pm 219	3051 \pm 65	1092 \pm 44
4	274 \pm 76	13640 \pm 507	869 \pm 22	710 \pm 8
5	1814 \pm 193	24765 \pm 2899	6592 \pm 1335	4783 \pm 397
6	2103 \pm 373	10596 \pm 2008	5351 \pm 849	4348 \pm 414
7	181 \pm 18	995 \pm 31	354 \pm 169	319 \pm 40
8	1521 \pm 303	6299 \pm 2125	4477 \pm 537	4094 \pm 1513

Tableau 13, 14. Incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes de souris recevant 100 mg/jour de caséine pendant 6 semaines (Tableau 13) et pendant 8 semaines (Tableau 14). Les cellules sont cultivées en présence de PHA ou de caséine. Les résultats sont la moyenne de 4 réplifications.

Tableau 13

souris	milieu seul	P.H.A (1/100)	caséine 50 ug	caséine 100 ug
1	1751±527	5173±686	9279±3403	5172±372
2	121±25	293±150	417±119	358±54
3	86±22	89±13	92±16	81±30
4	557±72	2808±366	816±112	750±189
5	102±6	1623±71	158±27	84±11
6	10609±737	18307±1661	37090±4097	33114±3213
7	80±8	735±107	738±204	825±74
8	5426±455	23285±2367	38694±8399	31758±2933

Tableau 14

souris	milieu seul	P.H.A (1/100)	caséine 50µg	caséine 100 µg
1	87±2	1220±210	203±42	197±13
2	453±65	7915±1941	919±160	713±38
3	118±31	3239±323	1656±173	1171±175
4	568±69	3371±139	5273±671	4359±295
5	6105±1311	19881±5030	19457±4613	12603±2321
6	2658±659	18053±5662	12854±4106	22065±8347
7	424±176	4754 ±406	2331±585	1422±12
8	48±18	385±157	162±12	273±61

D'après les résultats présentés dans la figure 15, on constate que les cellules issues des souris contrôles et des souris ayant reçu la caséine par voie digestive, répondent activement à la caséine et à la PHA. Dans le groupe de souris immunisées par voie intrapéritonéale, il n'y a pas de réponse. Cependant, il faut noter que dans chacun des lots un certain nombre de souris a un indice de stimulation inférieur ou égal à 1. Nous remarquons d'après les résultats donnés dans les tableaux 10,11,12,13,14, que parmi ces souris, celles qui répondent mal aux caséines répondent aussi mal à la PHA. Nous avons fait l'analyse de variance unifactorielle de tous les lots pour comparer les effets de la PHA et des caséines.

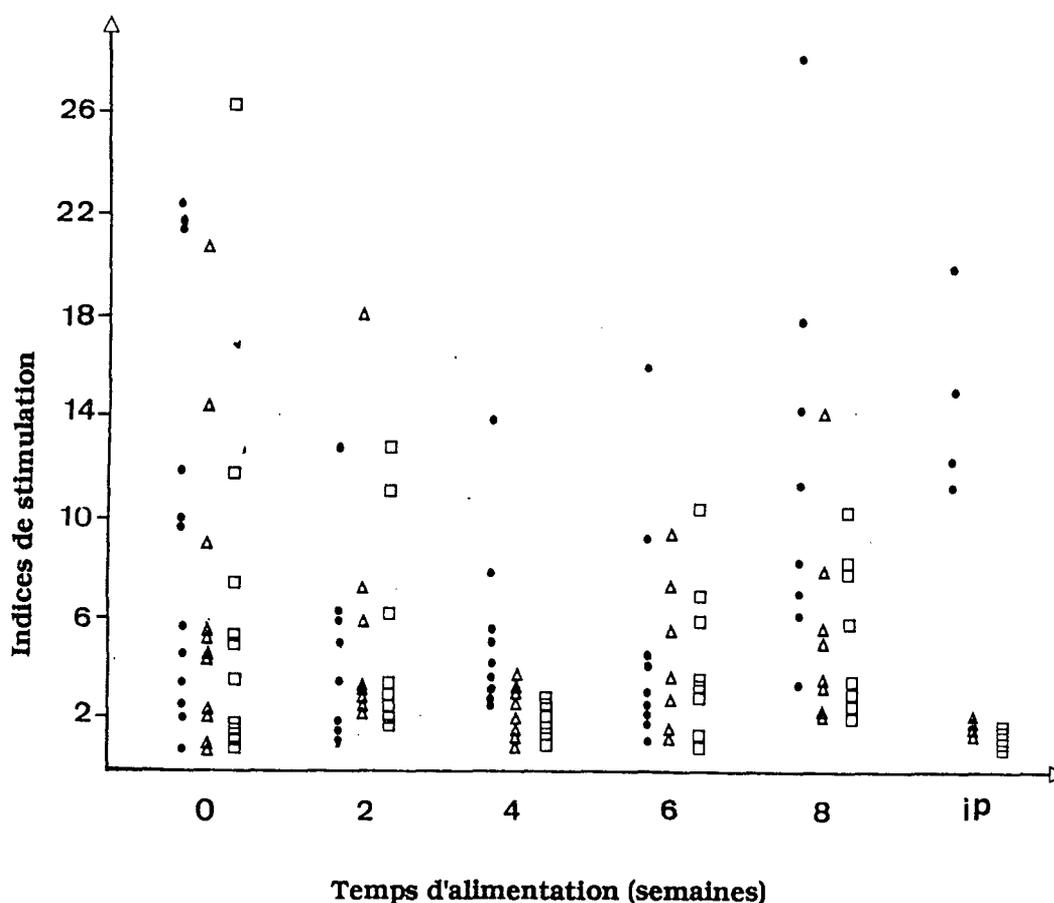


Figure 15. Index de stimulation lymphoblastique des cellules de souris recevant de la caséine (100 mg/jour). Les cellules sont cultivées en présence de ● : PHA, Δ : caséine 50 µg/ml, □ : 100 µg/ml.

IP : immunisation par voie intrapéritonéale.

3.2.1. Réponses à la PHA

Comme le montre le tableau 15, l'effet de la PHA est significativement plus élevé dans le lot de souris immunisées par voie intrapéritonéale (lot 6) que dans les lots de souris immunisées par voie digestive jusqu'à 6 semaines (lots 2,3,4). Le fait que ces cellules peuvent répondre activement à la PHA indique l'état normal des lymphocytes.

TABLEAU 15 : ECHELLE D'INDICE DE STIMULATION (IS) DE DIFFERENTS LOTS DE SOURIS EN PRESENCE DE PHA ET DE CASEINE

Lot	PHA	Lot	Caséine 50(mg/ml)	Lot	Caséine 100(mg/ml)
2	4,7 a	6	1,4 a	6	0,71a
4	5,0 a	3	2,2 a	3	1,7a
3	5,8 a	4	3,5 ab	4	3,2. ab
1	8,2 a	5	5,3 ab	5	5,1. ab
5	11,7 ab	2	5,6 ab	2	5,3 ab
6	14,4 b	1	7,9 b	1	8,3 a

Lot 1 : lot de souris contrôles

Lots 2, 3,4 et 5 : lots de souris alimentées en caséine pendant 2, 4, 6 et 8 semaines

Lot 6 : lot de souris immunisées par voie intrapéritonéale.

a et b : intervalles homogènes de groupes

a=b

L'alimentation en caséine poursuivie jusqu'à 8 semaines n'exerce aucun effet sur la réponse mitogénique aspécifique des cellules. Ceci est démontré par les valeurs de IS en présence de PHA (tableau 15) qui ne sont pas statistiquement différentes d'un lot à l'autre de souris ayant ingéré la caséine.

Les réponses lymphoblastiques à la PHA sont significativement plus fortes que les réponses aux caséines ($p < 0,01$ tableau 16). Ceci est un phénomène normal, les réponses aux mitogènes aspécifiques sont généralement plus fortes qu'aux antigènes spécifiques (JANOT *et al.*, 1970).

Tableau 16 : Test de Tuckey sur l'effet de la PHA et des caséines

Stimulant	PHA	A1	A2
	7,7	4,2	4
PHA	-	3,5**	3,7**
A1	-	-	0,2
A2	-	-	-

Significatif à 0,05 = 1,64

Significatif à 0,01 = 2,2

A1, A2 : Caséine 50 et 100 µg/ml

** : ($p < 0,01$).

3.2.2. Réponse aux caséines

Comme nous pouvons le constater sur le tableau 15, les indices de stimulation en présence de caséine ne sont pas significativement différents du lot contrôle (lot 1) sauf pour le lot 6 (souris immunisées par voie intrapéritonéale) et pour le lot 3 (caséine pendant 4 semaines) ($P < 0,05$). L'indice de stimulation est le plus faible dans ces deux derniers groupes. On peut supposer que ce résultat est dû à l'incapacité des cellules provenant des souris immunisées par voie intrapéritonéale à reconnaître l'antigène.

Des réponses en fonction du temps d'alimentation de façon similaire se produisent avec les deux concentrations de caséine (50 et 100 $\mu\text{g/ml}$). Si l'on considère l'échelle des IS (tableau 15), des valeurs les plus basses aux plus hautes, on constate que les lots se répartissent de la même façon sur cette échelle que ce soit pour les concentrations de 50 ou celles de 100 $\mu\text{g/ml}$. Pourtant, si on prend en compte l'ensemble des résultats, il ne sont pas significatifs en fonction de la concentration en caséine (tableau 16).

Les résultats présentés dans le tableau 15 montrent aussi que l'alimentation en caséine jusqu'à 8 semaines n'augmente plus la capacité lymphoblastique des cellules de souris. Il faut souligner que dans ces expériences, les "souris contrôle" que nous avons utilisées sont des souris déjà sensibilisées naturellement. Néanmoins, ces résultats montrent la capacité antigénique de la caséine au niveau lymphocytaire. De plus, il est à noter que l'alimentation chez des souris sensibilisées n'exerce plus aucune augmentation complémentaire dans la capacité lymphoblastique.

3.2.3. Discussion

Comme nous pouvons le constater à partir des résultats de ces expériences, les lymphocytes des souris alimentées en caséine ainsi que des "souris contrôle" répondent activement vis-à-vis de la PHA et de la caséine. Ces résultats conduisent à supposer que ces cellules sont immunocompétentes et qu'elles peuvent également reconnaître l'antigène *in vitro*. Ceci suggère que la caséine ingérée et absorbée est capable de sensibiliser les lymphocytes de souris.

3.2.3.1. Stimulation par la PHA

La réponse non spécifique à la PHA est une indication de la fonction lymphocytaire normale. C'est pourquoi les expériences portant sur les lymphocytes autorisent à voir dans la blastogenèse non spécifique un moyen valable de l'exploration de l'immunocompétence. Ceci est important dans l'évaluation de l'état normal des cellules (WOLFROMM, 1972)

De plus, les corrélations entre réponses spécifique et non spécifique sont nombreuses et permettent de penser que la blastogenèse non spécifique n'est pas une pure curiosité de laboratoire. La morphologie des

cellules, la synthèse des lymphokines, les délais de réponse des lymphocytes sont autant de points permettant de penser que la réponse aux mitogènes représente la première étape de la réaction immunologique (DOSCH *et al.*, 1980).

La capacité des lymphocytes, sensibilisés *in vivo*, à proliférer *in vitro* en présence de mitogènes comme la PHA est utilisée dans le but de diagnostiquer les cas d'allergie (SAURAT *et al.*, 1978; FALLSROM *et al.*, 1983; CAVAILLON et DAVID, 1987) ou les problèmes de malnutrition (BOUNOUS et KONGSHAVN, 1985; KUVIBIDILA, 1986). Toutefois, les résultats ne sont pas encore bien clairs dans ce dernier cas. Dans notre travail, nous avons remarqué une blastogenèse significativement plus forte ($p < 0,05$) en présence de PHA chez des souris immunisées par voie intrapéritonéale alors que dans ce lot, la blastogenèse en présence de caséine est la plus faible ($P < 0,05$).

Il est intéressant d'étudier les résultats de SCOTT (1972) et MITCHELL *et al.* (1973) qui ont trouvé une inhibition de la réponse à la PHA et à la concanavaleine A quelques jours après l'injection de *C. parvorum* ou de BCG. Il paraît séduisant de supposer que les lymphocytes déjà engagés dans une réponse contre un antigène sont devenus réfractaires à un autre stimulus.

3.2.3.2. La réponse des "souris contrôles"

Les "souris contrôle" ont reçu une alimentation dépourvue de caséine depuis qu'elles sont arrivées au laboratoire. Ces souris répondent positivement à la caséine *in vitro*. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces souris avant leur arrivée à l'âge d'environ 6 semaines ont été élevées chez le fournisseur avec une alimentation normale, c'est-à-dire contenant de la caséine. Ces souris ont été soumises à un régime sans caséine seulement un mois avant l'expérience.

En effet, il est à noter que la sensibilisation à un composant alimentaire peut se développer naturellement chez des animaux qui consomment cet aliment (COOMBS *et al.*, 1983; SJOELANDER et MAGNUSSON, 1987). Il faut aussi savoir que les animaux de notre étude ont consommé une alimentation contenant de la caséine, depuis leur plus jeune âge alors que la muqueuse intestinale immature des souriceaux permet le passage des grosses molécules d'origine alimentaire (UDALL *et al.*, 1981; STERN *et al.*, 1984; MARCON-GENTY *et al.*, 1989; HEYMANN *et al.*, 1986; WALKER, 1988). Le transfert des antigènes par le lait maternel est également possible. En effet, le passage des protéines alimentaires maternelles dans le lait humain a été récemment rapporté (KILSHAW et CANT, 1984).

Si des molécules de caséine, contenues dans l'alimentation ordinaire des souris ont été absorbées, elles l'ont été peu à peu, en faible quantité mais sans interruption pendant le premier mois de la vie des souriceaux. De plus, le fait que les souris soient soumises à un régime sans caséine au moins pendant 4 semaines avant l'expérimentation pourrait être un élément permettant l'apparition de réactions immunologiques *in vivo*. En outre, il a été prouvé qu'une alimentation contenant de l'albumine

en faible quantité induit une réponse spécifique chez des souris nouveau-nés mais pas chez des souris adultes (UDALL *et al.*, 1981).

En considérant le traitement subi par les souris et en observant les résultats du TTL, on peut émettre deux suggestions :

- 1) un mois sans caséine pourrait être une période qui permettrait à une chaîne de réactions immunologiques de se développer.
- 2) la période d'un mois sans caséine n'a pas éliminé l'existence de cellules activées.

Toutefois, nous nous interrogeons sur la nature des sous populations de cellules qui réagissent pendant la culture. Il est possible que ce soient des cellules à mémoire provenant de cellules activées. Ces résultats nous conduisent à aller plus loin et à rechercher l'effet de l'alimentation en caséine chez des souris "non contaminées" par celle-ci.

3.2.3.3. Réponses des souris immunisées par voie intrapéritonéale

Dans cette expérience, nous avons immunisé les souris en leur injectant, en intrapéritonéale, la caséine seule, sans aucun adjuvant dans le but d'avoir une réponse spécifique à la caséine. Ces souris ont été alimentées sans caséine pendant environ 2 mois avant de commencer l'immunisation qui a duré 3 semaines. Le fait que cette immunisation n'aboutisse pas à la sensibilisation des lymphocytes nous a conduit à supposer que :

- soit les cellules à mémoire n'existent plus dans les rates de souris après 2 mois de régime sans caséine.
- soit la sensibilisation des souris à la caséine nécessite l'emploi d'un adjuvant.

Toutefois, quel que soit le résultat de l'immunisation intrapéritonéale, les réponses au TTL auraient dû être positives car on peut supposer que ces souris sont identiques aux "souris contrôle" et qu'elles sont déjà sensibilisées naturellement.

Selon la voie d'introduction de l'antigène, la stimulation antigénique des cellules immunocompétentes s'effectuera dans des sites totalement différents (ISHIZAKA, 1985; RICCI *et al.*, 1986). Il a été constaté que pour réussir l'immunisation d'un animal il était nécessaire de faire attention au type et aux doses d'antigène, à la souche et à l'âge de l'animal, à la méthode et à la nécessité d'un adjuvant (LAKE, 1983; MALO et MORIN, 1986). Tous ces éléments pourraient expliquer la baisse de stimulation des lymphocytes des souris immunisées par voie intrapéritonéale.

Dans le but d'avoir une réponse spécifique, nous avons immunisé les souris à la caséine, sans aucun adjuvant. Peut-être est-il nécessaire de réaliser une mise au point pour réussir à sensibiliser des souris à la caséine par voie parentérale. Il est à noter que ce lot a été préparé seulement dans le but d'avoir un témoin positif.

Cependant, il a été mis en évidence que la digestion et l'absorption de la protéine pourraient affecter les caractéristiques immunologiques de l'antigène ingéré (BRUCE et FERGUSON, 1986a; MOWAT, 1987). Le phénomène de filtration biologique de l'antigène ingéré est aussi proposé (BRUCE et FERGUSON, 1986a; BRUCE et FERGUSON, 1986b; MOWAT, 1987; WALKER, 1988). Il est évident aussi que l'absorption de molécules alimentaires, notamment de protéines entières chez l'homme sain existe et que cela n'est pas toujours en corrélation avec les manifestations immunologiques (PAGANELLI et LEVINSKY, 1980; HUSBY *et al.*, 1985).

Ces résultats nous conduisent à constater que les molécules de caséine entière introduites dans la cavité péritonéale n'ont pas la même capacité à sensibiliser les lymphocytes circulant que les fragments de caséine absorbés à travers la muqueuse intestinale.

3.2.3.4. Effet de l'ingestion de la caséine

Les résultats du test TTL démontrent la capacité lymphoblastique des cellules vis-à-vis de la caséine et suggèrent l'antigénicité de ce composé. De plus, le temps d'ingestion et l'âge auquel la caséine a été introduite jouent un rôle important dans le processus de sensibilisation. Dans notre expérience, nous avons observé que la sensibilisation chez les souris a eu lieu naturellement avant l'âge de 1 mois. Une supplémentation continue en caséine jusqu'à 8 semaines peut maintenir ou restimuler la sensibilisation. Néanmoins, une période exempte de caséine de 2 mois au moins peut éliminer la sensibilisation. Ceci est démontré par les faibles réponses des souris immunisées par voie intrapéritonéale.

A partir de ces résultats expérimentaux, il reste difficile de dire si les souris sont allergiques ou pas et donc si la caséine est un allergène pour elles. Bien que l'on sache que chez l'homme un TTL positif à un allergène indique que cet allergène est responsable de la réaction allergique chez le malade et qu'il existe une bonne corrélation entre la réponse lymphoblastique *in vitro* aux protéines du lait et les symptômes de l'allergie à ces biomolécules.

3.3. MISE EN EVIDENCE DES REACTIONS IGE-DEPENDANTES CHEZ DES SOURIS "NORMALES" ALIMENTEES EN CASEINE

Ces expériences ont été effectuées chez des souris soumises au même traitement que celui décrit dans le chapitre précédent, c'est-à-dire que différents lots de souris ont reçu de la caséine (100 mg/j) pendant 2, 4, 6 ou 8 semaines par voie orale. De plus, un groupe de souris reçoit la caséine par injection intrapéritonéale et un autre lot servant de témoin ne reçoit pas de caséine.

Ces expériences ont pour but d'étudier l'effet de l'alimentation en caséine dans les manifestations d'allergie immédiate qui résulte de la dégranulation des mastocytes. La libération d'histamine par ces cellules effectrices en présence d'antigène spécifique indique que des IgE ont été produites pendant l'ingestion de la caséine et qu'elles se sont fixées sur les sites récepteurs de la membrane des mastocytes. Tous ces événements peuvent être mis en évidence par le TLAHM.

3.3.1. Le taux total d'histamine

Avant de faire le TLAHM proprement dit, nous avons mesuré le taux total d'histamine pour savoir si la caséine jouait un rôle dans l'accumulation d'histamine dans les mastocytes.

Comme on peut le constater sur le tableau 17, il semble exister une augmentation du taux d'histamine totale dans les cellules de mastocytes en fonction du temps d'alimentation en caséine. Les taux d'histamine trouvés dans ces conditions expérimentales se situent entre 2 et 6 nmol par 10^5 cellules. D'après l'analyse statistique unifactorielle (logiciel statgraph), cette augmentation est significative ($p < 0,01$) à partir de 4 semaines d'alimentation.

Il semble donc que l'ingestion de caséine puisse mener à une accumulation d'histamine dans les cellules de mastocytes. Cette augmentation favoriserait le phénomène de dégranulation.

TABLEAU 17. TAUX D'HISTAMINE TOTAL MESURE DANS DES MASTOCYTES (nMOL/ 10^5 -CELLULES) DE SOURIS RECEVANT PAR VOIE ORALE DES CASEINES (100mg/JOUR) PENDANT 2, 4, OU 8 SEMAINES OU RECEVANT DES CASEINES PAR VOIE INTRAPERITONEALE (IP). LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN nMOLES/ 10^5 CELLULES.

Souris	Temps d'ingestion des caséines (semaines)					
	0	2	4	6	8	IP
1	0,5	0,5	7,4	5,9	5,9	4,9
2	3,6	2,1	6,7	7,1	5,8	5,4
3	5,4		7,1	5,4	7,6	6,9
4	4,1		6,7	6,0	7,5	5,8
Moyenne	3,4	1,3	6,9*	6,1*	6,6*	5,8*

* : $p < 0,01$

On constate qu'il y a une grande variation dans la concentration d'histamine, non seulement d'un lot à l'autre, mais aussi d'un individu à l'autre dans un même lot.

SIRAGANIAN et HAZARD (1979) et RAZIN *et al.*, (1981) ont donné des concentrations en histamine de 0,8 et 1,2 nmoles/ 10^5 cellules chez des rats alors que BEFUS *et al.*, (1982) et ATKINSON *et al.*, (1979) ont rapporté des taux de 1,5 et 30-50 nmoles dans des mastocytes de souris respectivement. Nos propres résultats se situent entre ces deux dernières valeurs.

3.3.2. Test de libération antigénique d'histamine dans les mastocytes (TLAHM)

Comme le montre la figure 16, les taux d'histamine libérée spontanément et libérée en présence de caséine ne sont pas significativement différents et ceci pour l'ensemble des souris de chaque lot. On peut donc dire que l'histamine libérée en présence de la caséine ne peut pas être attribuée à une libération antigénique spécifique.

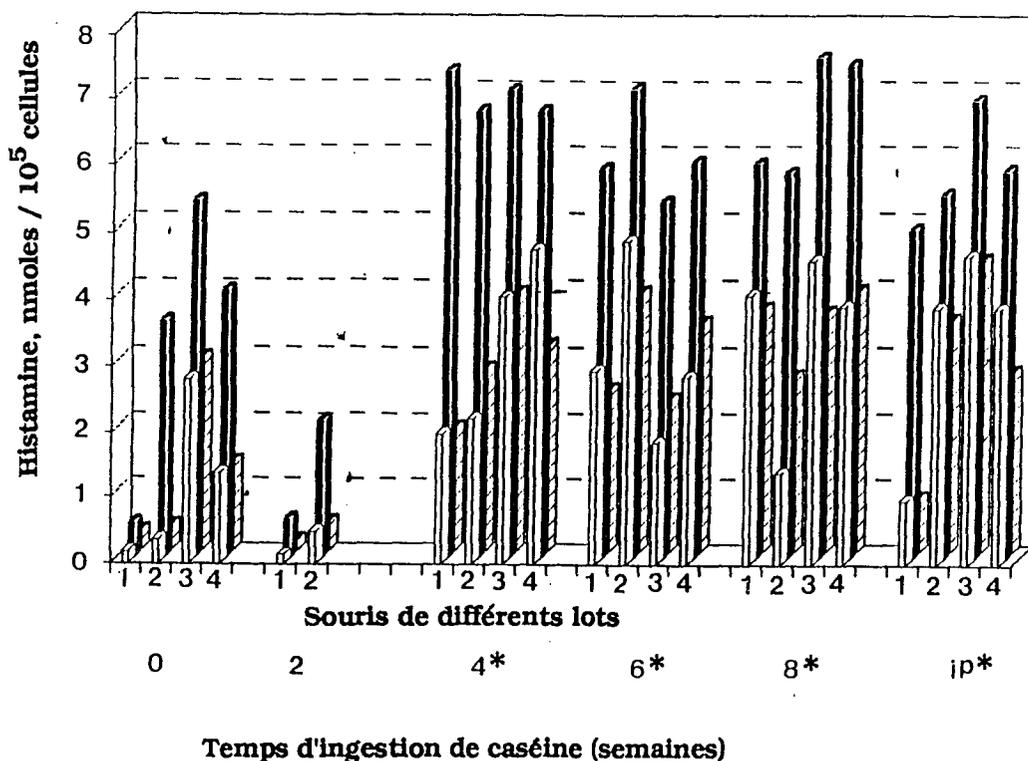


Figure 16. Libération d'histamine à partir de mastocytes de souris contrôles, recevant la caséine par voie orale à raison de 100 mg/jour et immunisées par voie intrapéritonéale.

□: Histamine libérée spontanément; ■: Histamine libérée en totalité; ▨: Histamine libérée en présence de 20 µg/ml de caséine. Les 4 derniers lots sont significativement plus élevés que le lot de souris contrôles

Par ailleurs, on peut observer que lorsque le taux d'histamine totale est plus élevé, parallèlement, le taux d'histamine libérée spontanément ou en présence de caséine est également plus élevé. L'histamine accumulée dans le mastocyte pourrait éventuellement contrôler sa libération et pourrait donc, indirectement, contrôler la sévérité de la manifestation allergique.

Ces résultats permettent de dire que l'alimentation en caséine n'a pas d'influence sur la production d'IgE spécifiques anti-caséines chez des "souris normales" et sans cette immunoglobuline sur la surface des mastocytes, la caséine n'induit pas la libération d'histamine par les cellules.

3.3.3. Le test cutané

Ce test a pour but de reproduire localement une réaction allergique, le plus souvent immédiate, en introduisant dans le derme une dose infime de l'allergène (caséine). Cette réaction cutanée est due à la fixation d'IgE spécifiques (dans ce cas, spécifiques de la caséine) sur les récepteurs membranaires des mastocytes de la peau. La réintroduction de la caséine a pour conséquence locale la dégranulation de ces mastocytes avec libération rapide (10-15 min) d'histamine (BENVENISTE, 1986), de SRS-A et d'autres médiateurs produisant une papule entourée d'une réaction érythémateuse.

Nous avons réalisé des tests cutanés intradermiques chez les souris ayant reçu, soit l'immunisation intrapéritonéale, soit l'alimentation en caséine et chez des souris "contrôles". Aucun de ces tests ne s'est révélé positif, quel que soit le temps d'observation (1, 4 et 24 heures après l'injection). On peut donc penser que les souris en expérience ne produisent pas d'immunoglobulines de type E, spécifiques de la caséine.

3.3.4. Discussion

La mise en évidence des réactions IgE dépendantes est réalisée en utilisant des mastocytes intrapéritonéaux (CMP). Le rôle de ces mastocytes dans l'allergie immédiate et la réaction anaphylactique ont été très étudiés car ils sont plus faciles à récupérer en grande quantité et sont presque purs dans la muqueuse intestinale (WEST, 1986; GALLI, 1987).

Il existe des mastocytes de la muqueuse intestinale qui sont situés dans la *lamina propria* (LP) et l'épithélium de l'intestin (BEFUS *et al* 1982). Ces cellules pourraient être plus appropriées aux études d'allergénicité au niveau du tractus digestif car elles pourraient être en contact direct avec l'allergène alimentaire dans la lumière intestinale. Ces cellules sont plus difficiles à récupérer, c'est pourquoi la plupart des expériences sont réalisées sur des mastocytes intrapéritonéaux. Toutefois, les travaux de l'équipe de BEFUS *et al.*, (1982) ont mis en évidence que les mastocytes muqueux et péritonéaux sensibilisés ont la même capacité à libérer l'histamine en présence d'allergène spécifique.

L'accumulation d'histamine dans les mastocytes de souris recevant de la caséine peut s'expliquer par les hypothèses suivantes :

- L'histamine provient de la décarboxylation de l'histidine (LEHNINGER, 1970). Or, la caséine contient environ 2,7 g d'histidine pour 100 g de protéine (POIFFAIT et ADRIAN, 1986) et l'enzyme de décarboxylation est concentrée dans les mastocytes.(WEST, 1986).
- Les peptides issus de la digestion enzymatique sont aptes à traverser la paroi intestinale. Par exemple, les hydrolysats pepsine-trypsine de divers aliments ont les vitesses relatives d'absorption suivantes (POIFFAIT et ADRIAN, 1986) :

caséine	100
viande de boeuf	80
soja	64
blé	82
colza	46

C'est ainsi que les oligopeptides de caséine contenant de la phénylalanine, thréonine, alanine, tyrosine, sérine, acide aspartique et histidine sont significativement mieux absorbés par l'homme que les acides aminés purs (SILK *et al.*, 1973).

- Les mastocytes ont bien la capacité de fixer l'histamine ou l'histidine. West (1986) a rapporté que de l'histamine et de l'histidine marquées sont absorbées rapidement par les cellules mastocytaires mais les mastocytes péritonéaux absorbent ces composés lentement. La demi-vie dans les milieux de l'histamine et l'histidine marquées est de 3 jours.
- Le taux d'histamine dans les mastocytes intrapéritonéaux dépend de l'âge et du poids des animaux (FRORJANC et ERJAVEC, 1983). L'augmentation d'histamine observée dans notre expérience est fonction du temps d'alimentation mais il est évident que lorsque l'alimentation est prolongée, les souris deviennent plus âgées.
- Par ailleurs, l'augmentation du taux d'histamine plasmatique intervient fréquemment après l'ingestion d'allergènes chez des individus connus pour être sensibilisés à ce même allergène alimentaire (LESSOF *et al.*, 1987; SAMPSON et JOLIE, 1984; CLINTON *et al.*, 1986).

D'après ces faits, on peut supposer que la consommation prolongée de caséine en grande quantité (100 mg/j) pourrait augmenter l'absorption de l'histidine qui serait ensuite transformée en histamine, laquelle s'accumulerait dans les mastocytes bien que d'autres cellules telles que les cellules muco-sales de l'intestin puissent synthétiser et fixer cet acide aminé. Il serait donc intéressant de réaliser une étude sur le métabolisme de l'histidine alimentaire marquée pour révéler la synthèse de son dérivé dans les mastocytes et la dégranulation de ces derniers.

Nos résultats de TLAHM (figure 16) montrent que l'alimentation en caséine chez des souris ne provoque pas une dégranulation des mastocytes. Ceci est en accord avec les résultats des tests cutanés qui indiquent l'absence d'IgE spécifiques anticasinées dans le sérum. Il est intéressant de noter que BENVENISTE *et al.*, (1977) ont montré une forte dégranulation des basophiles de lapin sensibilisés à l'albumine bovine sans qu'ils puissent détecter la présence d'IgE spécifiques dans le sérum. Ils ont

constaté que les molécules d'IgE produites durant la réponse immunitaire sont fixées préférentiellement sur les basophiles et les mastocytes et c'est uniquement quand il y a un surplus de production d'IgE que l'anticorps atteint un niveau décelable dans le sérum. Ceci peut indiquer que le TLAHM est un test plus sensible que la détermination des IgE circulantes ou le test cutané pour évaluer l'hypersensibilité immédiate. De plus, il a été récemment constaté que la positivité du TTL vis-à-vis des protéines du lait n'a pas été concomitant avec celle du dosage d'IgE sériques chez des sujets allergiques à ces protéines (VAN SICKLE *et al.*, 1985; ALBANI *et al.*, 1989).

3.4. CARACTERISTIQUES DES HYDROLYSATS DES CASEINES

Avant la traversée de la paroi intestinale, la caséine est soumise au processus d'hydrolyse tout au long du tractus digestif. C'est ainsi que les molécules absorbées deviendraient des composés qui pourraient être les antigènes activant les lymphocytes.

Pour essayer de comprendre ce qui se passe dans le tube digestif, nous avons préparé des hydrolysats de caséine en utilisant des enzymes digestives pour fragmenter la caséine, à savoir : pepsine, trypsine et chymotrypsine. Nous avons testé d'abord la capacité des lymphocytes des souris alimentées en caséine à reconnaître *in vitro* les hydrolysats enzymatiques digestifs. Ensuite, nous avons utilisé ces mêmes hydrolysats pour étudier l'absorption intestinale de ces molécules. Les enzymes utilisées dans ces expériences sont celles immobilisées sur des perles d'agarose.

Pour contrôler les hydrolysats, nous avons déterminé le degré de libération de groupements-NH₂ et leur migration électrophorétique (PAGE).

3.4.1. Courbes étalons de lysine, leucine et caséine

La figure 17 représente les courbes étalons mises au point lors de l'adaptation de la méthode d'OPA (ortho-phthalaldéhyde) pour la détermination des groupements -NH₂ libérés durant l'hydrolyse. Comme on peut le constater, pour une même molarité, la caséine et la leucine n'ont pas la même absorbance. Ceci peut être dû à la configuration moléculaire de la caséine qui empêcherait un certain nombre de ses groupements NH₂ à réagir avec l'OPA. La lysine ayant deux groupements NH₂ libres, présente des absorbances presque deux fois plus fortes que la leucine. Dans toutes nos expériences, nous avons donc utilisé la leucine comme étalon pour la détermination des concentrations des groupements-NH₂ libérés durant l'hydrolyse de la protéine.

3.4.2. Hydrolyse de la caséine par la pepsine

La figure 18, montre qu'une quantité croissante de groupements-NH₂ est libérée durant l'incubation à 37°C, 30 minutes en fonction de la quantité d'enzyme employée.

A 1 % de caséine (2 ml), le plateau commence à partir de 3 mg de pepsine, c'est-à-dire à un rapport enzyme/substrat (E/S) égal au 3/20. En utilisant la caséine à 4 %, le plateau commence à 12 mg d'enzyme (E/S = 12/80). Dans ces conditions expérimentales, le substrat est donc en quantité limitante pour un rapport E/S = 1/7.

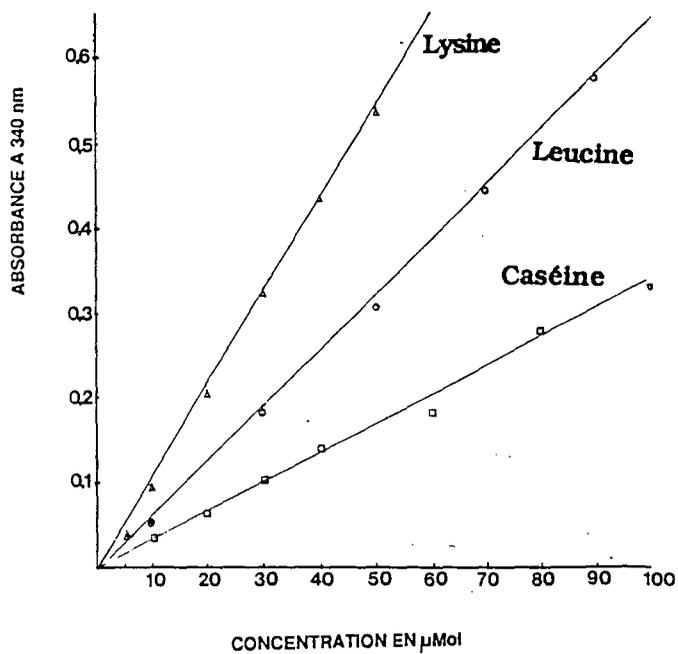


Figure 17. Mesure des groupements $-NH_2$ par la méthode à l'OPA

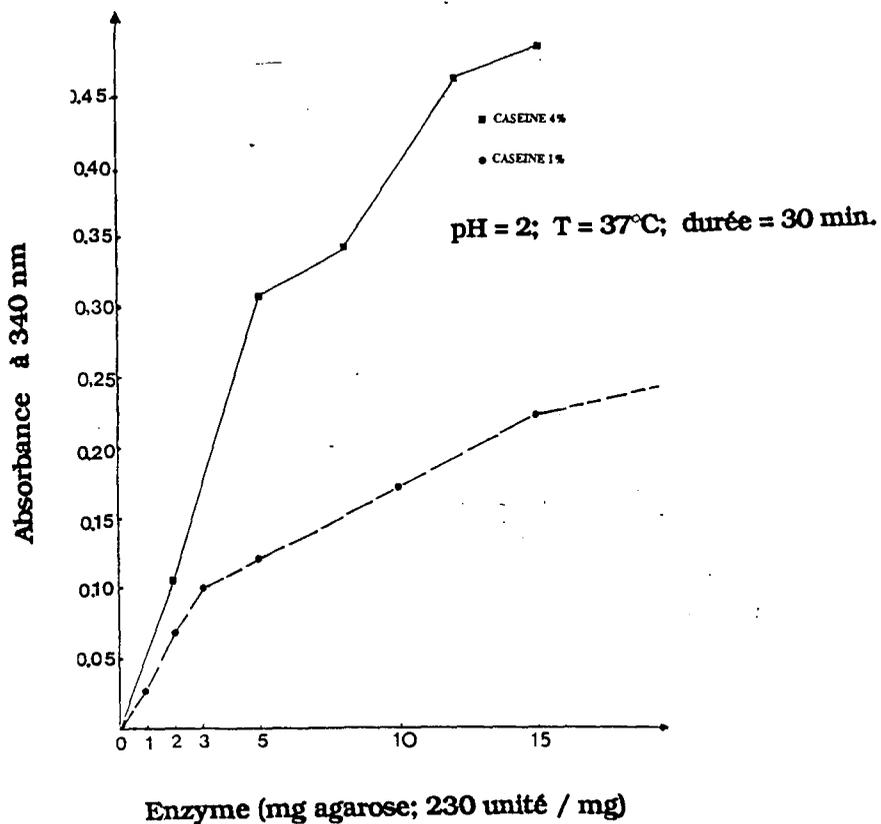


Figure 18. Mesure des groupements $-NH_2$ libérés au cours de l'hydrolyse de la caséine par la pepsine immobilisée. Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

Comme on peut l'observer sur les figures 19, la séparation électrophorétique des hydrolysats de caséine sur PAGE-Urée 4M montre que la caséine β est entièrement dégradée à partir de 3 à 5 mg d'enzymes tandis que la disparition de la caséine α ne commence que pour une concentration en enzyme de 10 mg. Sur l'électrophorèse PAGE-SDS (figure 20) on voit la diminution graduelle des gros peptides et l'accumulation des fragments de $PM < 124$ Kd.

Nous avons également réalisé l'hydrolyse en fonction du temps d'incubation. Pour cette expérience, nous avons utilisé une solution de caséine à 2 % soumise pendant 1, 2, 3, et 4 heures à l'action de la pepsine. La cinétique de la libération du groupements-NH₂ avec un rapport E/S = 1/4 fait apparaître un plateau qui commence après 2 heures d'incubation (figure 21).

La séparation de ces hydrolysats par électrophorèse sur gel en présence de SDS montre que la caséine est entièrement dégradée à partir de 2 heures d'hydrolyse (figure 22). Ces hydrolysats contiennent des peptides de moins de 12000 Daltons. L'hydrolysat obtenu après 2 heures d'incubation est conservé. Il sera utilisé comme antigène dans des expériences ultérieures où il servira de substrat pour la trypsine et la chymotrypsine.

3.4.3. Traitement de l'hydrolysat pepsique par trypsine-chymotrypsine

L'hydrolysat pepsique (P) est traité par le mélange enzymatique. Dans les conditions opératoires utilisées, le plateau de la production de NH₂ apparaît à partir de 1 heure d'incubation (figure 23). La disparition des bandes correspondant aux peptides majeurs d'hydrolysats pepsique (figure 22) s'observe aussi après 1 heure d'hydrolyse (figure 24). Cet hydrolysat contient des peptides dont le PM est inférieur à 12,4 kDa, si l'on compare avec la cytochrome. Cet hydrolysat pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC) servira également d'antigène.

3.4.4. Discussion

3.4.4.1. La méthode d'OPA pour la détermination de groupements-NH₂ libres

Cette technique a été décrite et les différents paramètres ont été bien étudiés par CHURCH *et al.*, (1985). Nous avons adopté cette méthode sans modification. Elle s'est révélée d'emploi facile. Pour éviter l'interférence des protéines non hydrolysées, on les précipite au préalable par le TCA à 10 %. Le dosage des groupements NH₂ est fait sur le surnageant après centrifugation.

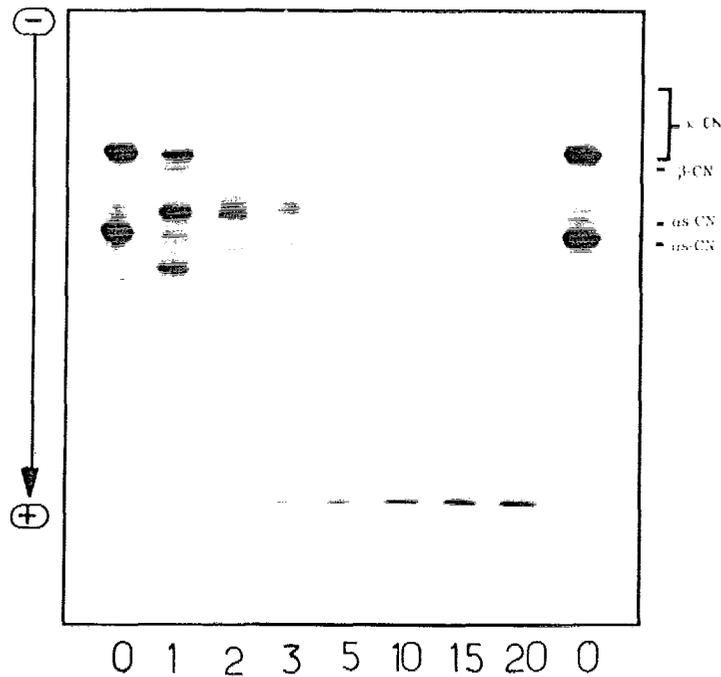


Figure 19. Electrophorèse en PAGE-urée des caséines et de leurs hydrolysats pepsiques *

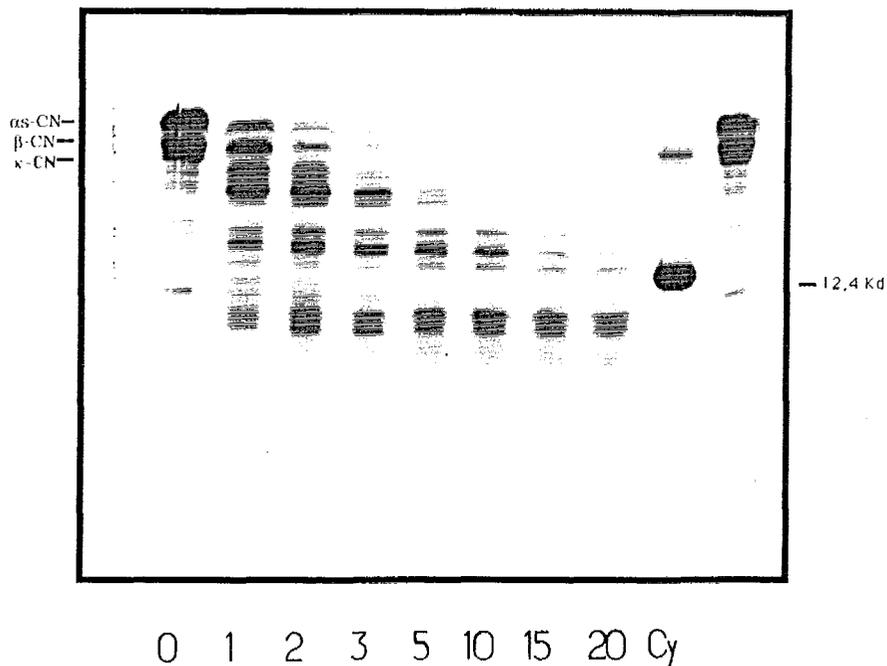


Figure 20. Electrophorèse en PAGE-SDS (15% d'acrylamide) des hydrolysats de caséine par la pepsine *.

* La pepsine est immobilisée sur l'agarose (activité enzymatique : 230 -U/mg) Conditions d'incubation : 30 min, pH 2 à 37°C.

0 : Caséine entière; 1,2,3,5,10,15,20 : Hydrolysats de caséine obtenus en utilisant 1,2,3,5,10,15,20 mg de la pepsine, respectivement .

Cy : Cytochrome C, PM = 12,4 kDa.

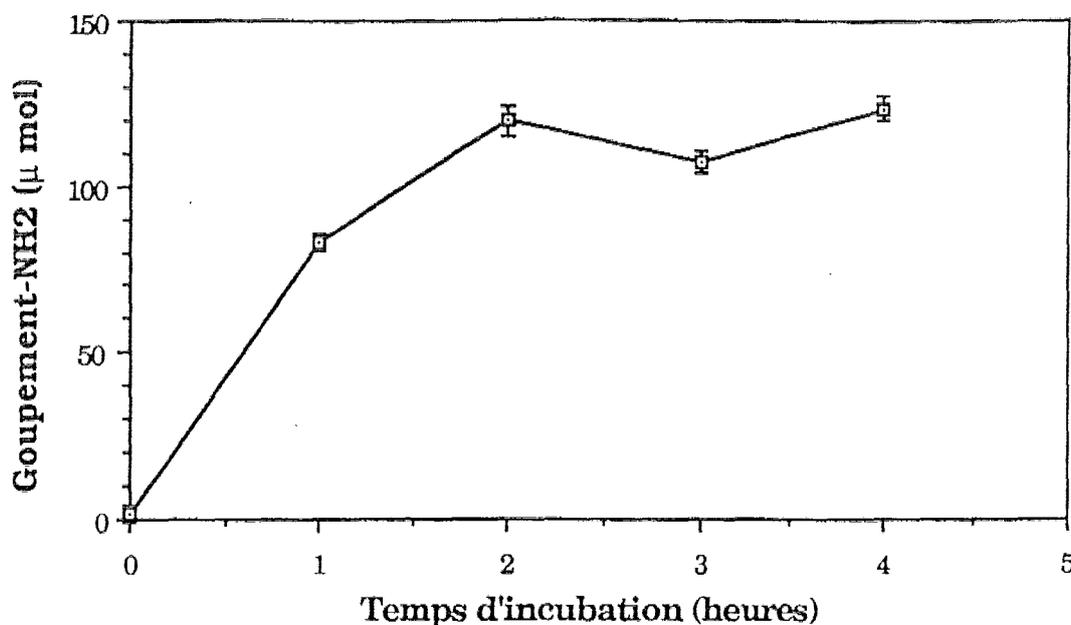


Figure 21. Cinétique de la libération des groupements $-NH_2$ de la caséine sous l'action de la pepsine en fonction du temps *.

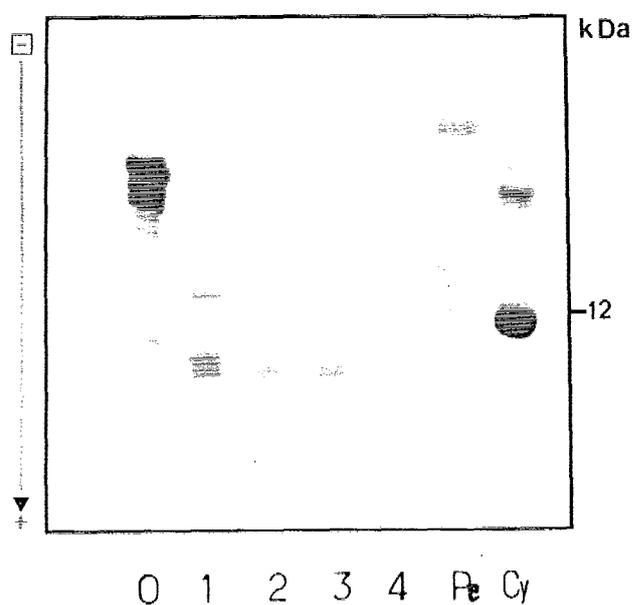


Figure 22. Electrophorèse en PAGE-SDS (15 % d'acrylamide) des hydrolysats de caséine obtenus par l'action de la pepsine en fonction du temps d'hydrolyse.

0, 1, 2, 3, 4 : 0, 2, 3, 4 heures d'incubation. Pe : pepsine soluble (PM 34,5 kDa). Cy : Cytochrome C, PM = 12,4 kDa.

* : Conditions d'incubation : pH 2 à 37°C; E/S = 1/4. La pepsine est immobilisée sur l'agarose (activité enzymatique : 230 U/mg).

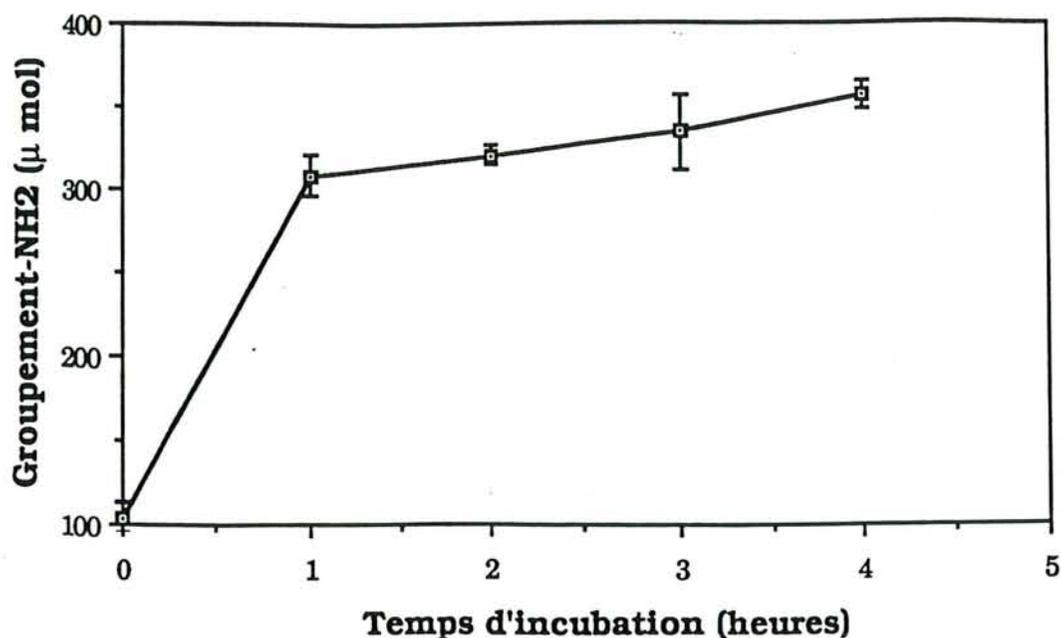


Figure 23. Cinétique en fonction du temps de la libération des groupements -NH₂ à partir d'hydrolysats pepsiques sous l'action de la trypsine-chymotrypsine

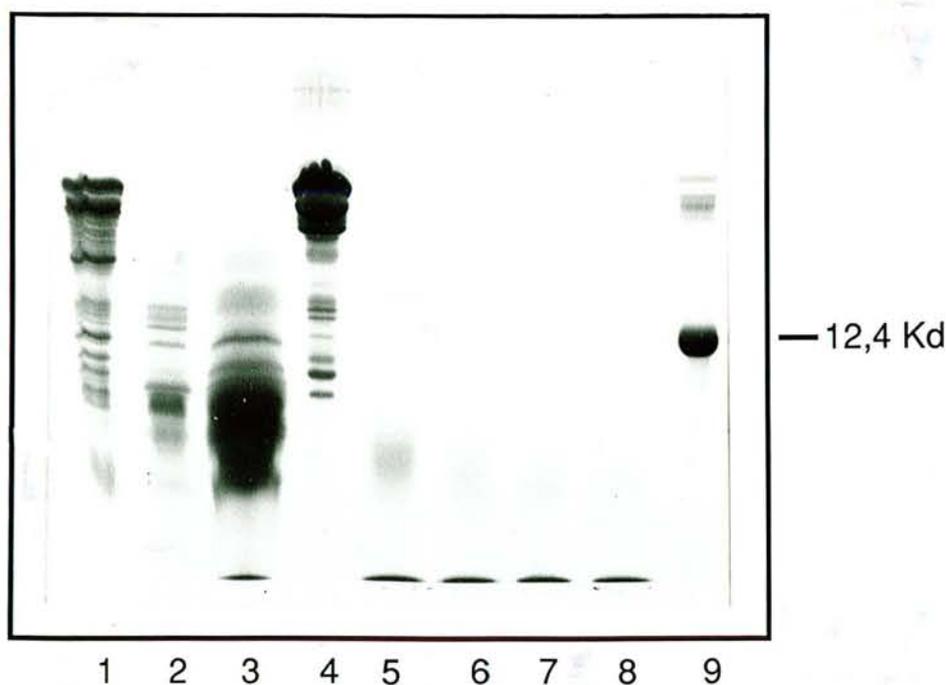


Figure 24. Electrophorèse en PAGE-SDS (15% d'acrylamide) des caséines et de leurs hydrolysats pepsiques (P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC)

1. Contrôle avec enzyme (dépot : 80 µg).
2. Hydrolysats pepsique, 1 h (dépot : 56 µg).
3. Hydrolysats pepsique, 2 h (dépot : 100 µg).
4. Contrôle sans enzyme (dépot : 90 µg)
5. Hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique, 1 h
6., 2 h
7., 3 h
8., 4 h
9. Cytochrome C, PM = 12 kDa

Conditions d'incubation : 2 h à 37°C à pH 2 pour la pepsine; E/S = 1/4

à pH 7,4 pour la trypsine -chymotrypsine; E/S = 3/8

3.4.4.2. Taille théorique des molécules de peptides issus des hydrolyses

La pepsine (EC 3.4.23.1) est une endoprotéase. C'est une aspartate protéase avec un pH optimum inférieur à 2. Elle coupe en principe les liaisons peptidiques dont le groupement-NH₂ est fourni par un acide aminé aromatique (Phe, Tyr ou le Trp). Elle a peu d'action sur les liaisons peptidiques dont le groupement NH₂ est donné par les acides aminés acides (Glu, Asp).

La trypsine (EC 3.4.21.4) et la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) sont des endoprotéases ainsi que des peptidases. Elles sont sécrétées par le pancréas et se trouvent dans le duodénum. Elles ont un pH optimum d'environ 7-8. Elles dégradent, à leur tour, les produits provenant de l'hydrolyse de la pepsine. La trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques dont le carbonyle est porté par l'arginine ou la lysine. La chymotrypsine est active sur les liaisons peptidiques dont le groupement -COOH est porté par le Trp, Phe ou la Tyr et à un certain degré par la Leu ou la Met.

La caséine isoélectrique ou caséine "de Hammersten" comporte 4 constituants majeurs (α_{s1} , α_{s2} , β et κ). Si on se réfère à leurs structures primaires et aux travaux de PELLISSIER (1984), l'hydrolyse de ces molécules par les trois enzymes produira en théorie des fragments peptidiques de caséine qui ne seront pas supérieurs à 2400 D (figure 25, 26, 27, 28). En théorie, les hydrolysats contiendront qualitativement les mêmes types de peptides. Néanmoins, les peptides réellement libérés dépendront des conditions expérimentales (pH, tampon, temps d'incubation etc). La proportion quantitative de ces peptides variera d'une expérience à l'autre.

Dans nos expériences, nous observons la disparition graduelle de la caséine sous l'action de la pepsine avec apparition de peptides d'environ 12000 daltons. Puis, à leur tour, ces peptides sont dégradés progressivement par les 2 enzymes (trypsine-chymotrypsine) en fonction du temps d'incubation (figure 24).

La dégradation séquentielle de la caséine a été rapportée par d'autres auteurs. Par exemple, la α_{s1} est hydrolysée en α_{s1} -I et son complément. Le peptide α_{s1} -I est dégradé à son tour pour donner des peptides nommés α_{s1} -II, α_{s1} -III et IV. Le premier peptide (α_{s1} -I a été mis en évidence *in vivo* dans des hydrolysats de caséine dans l'estomac de rat (MIRANDA et PELISSIER, 1981). TRIEU-CUOT (1981) a estimé les masses moléculaires des fragments α -I, II, III et IV, respectivement à 21234, 17600 et 15600 Da. Ces estimations correspondraient à certains polypeptides observés dans nos hydrolysats pepsiques d'une heure d'incubation (si on se base sur l'analyse en PAGE-SDS). Mais, après hydrolyse de 2 heures par la pepsine, ces polypeptides sont tous dégradés en peptides de PM < 12000 daltons. De plus, le traitement de cet hydrolysats par la trypsine et chymotrypsine donne des peptides de masse moléculaire encore plus bas (figure 24).

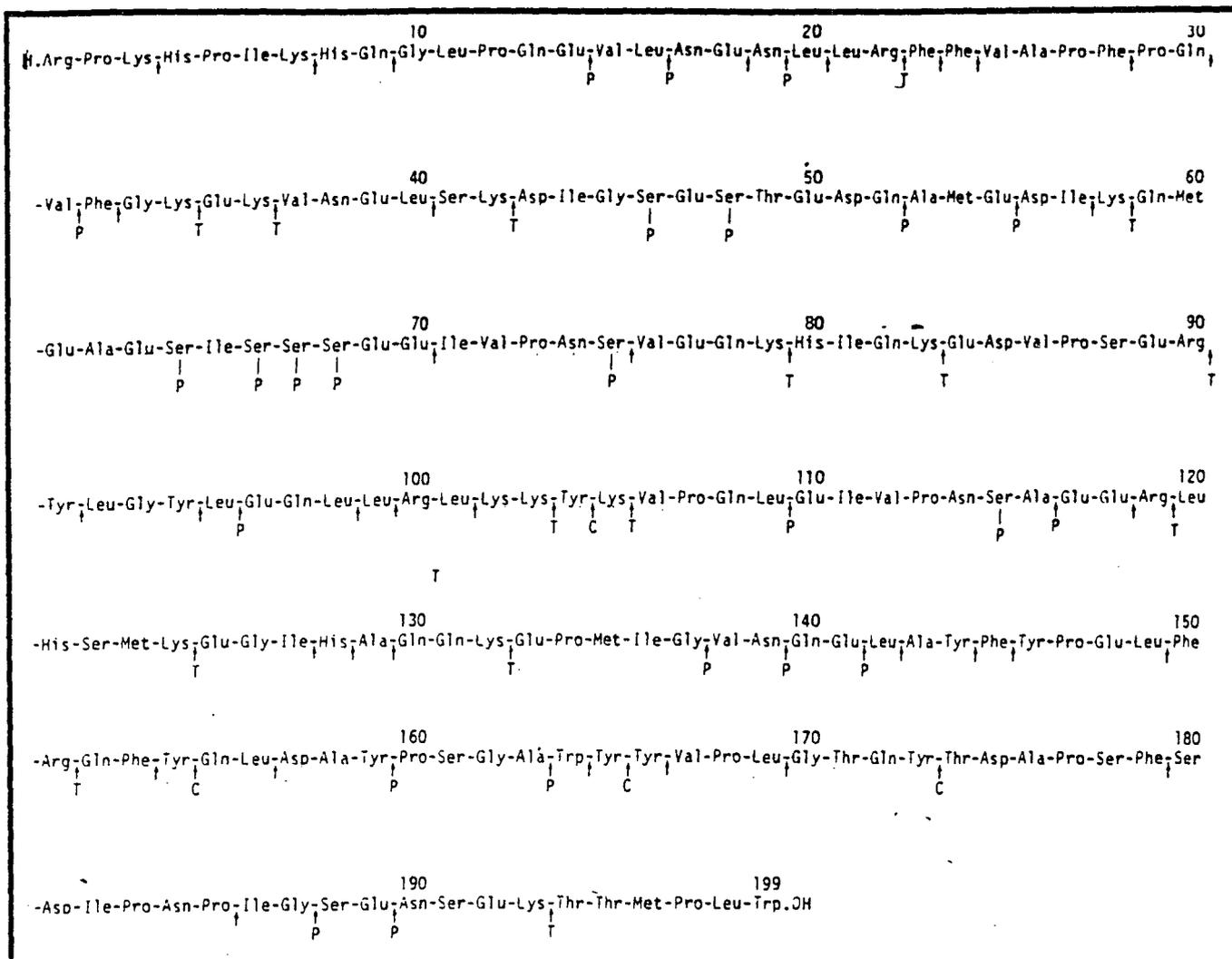


Figure 25. Structure primaire de la caséine α_1 -bovine. Les points de clivage des pepsine, trypsine et chymotrypsine sont identifiés (PELLISSIER JP, 1984).

P : Pepsine

T : Trypsine

C : Chymotrypsine

MEISEL et HAGEMEISTER (1987) ont étudié la protéolyse post-prandiale de la caséine chez des porcs. Ils ont trouvé que les produits de dégradation de la caséine par la pepsine lorsqu'ils quittent l'estomac contiennent des peptides ayant des poids moléculaires de moins 6000 Da. Ces peptides sont encore dégradés par la trypsine et la chymotrypsine dans le duodénum pour donner des peptides de moins de 2000 Da.

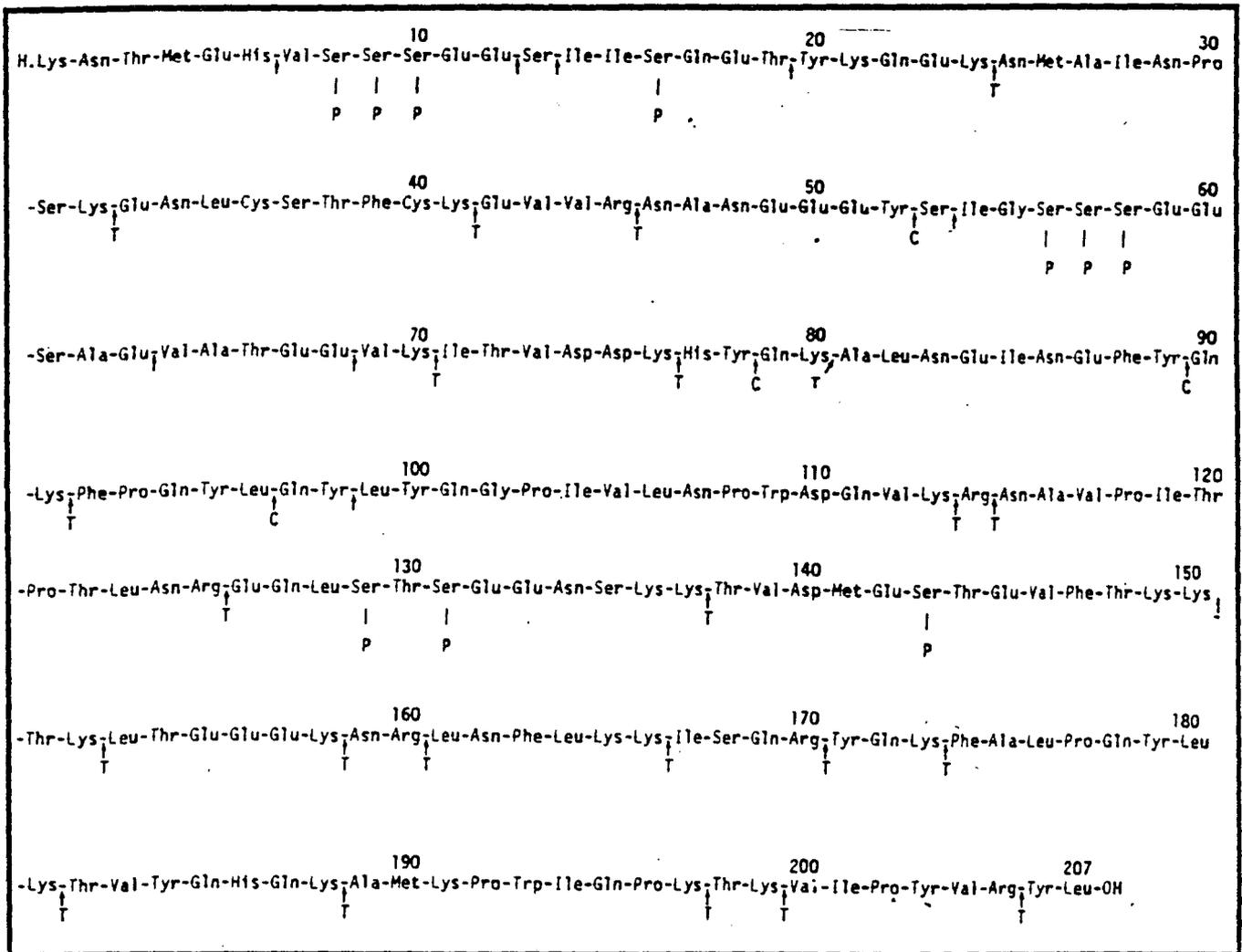


Figure 26. Structure primaire de la caséine α_2 -bovine. Les points de clivage des pepsine, trypsine et chymotrypsine sont identifiés (PELLISSIER JP, 1984).

P : Pepsine

T : Trypsine

C : Chymotrypsine

Après hydrolyse par la pepsine avec un temps d'incubation allant jusqu'à 4 H, on retrouve toujours dans nos hydrolysats des peptides d'environ 12000 Da qui semblent résistants à cette enzyme. L'hydrolysat pepsique (P) incubé 2 heures, que l'on utilise comme antigène est un mélange de peptides de 10000 à 2000 Da. De plus, la dégradation ultérieure de cet hydrolysat par la trypsine et chymotrypsine pendant 1 h donne des peptides de voisin de 2500 Da.

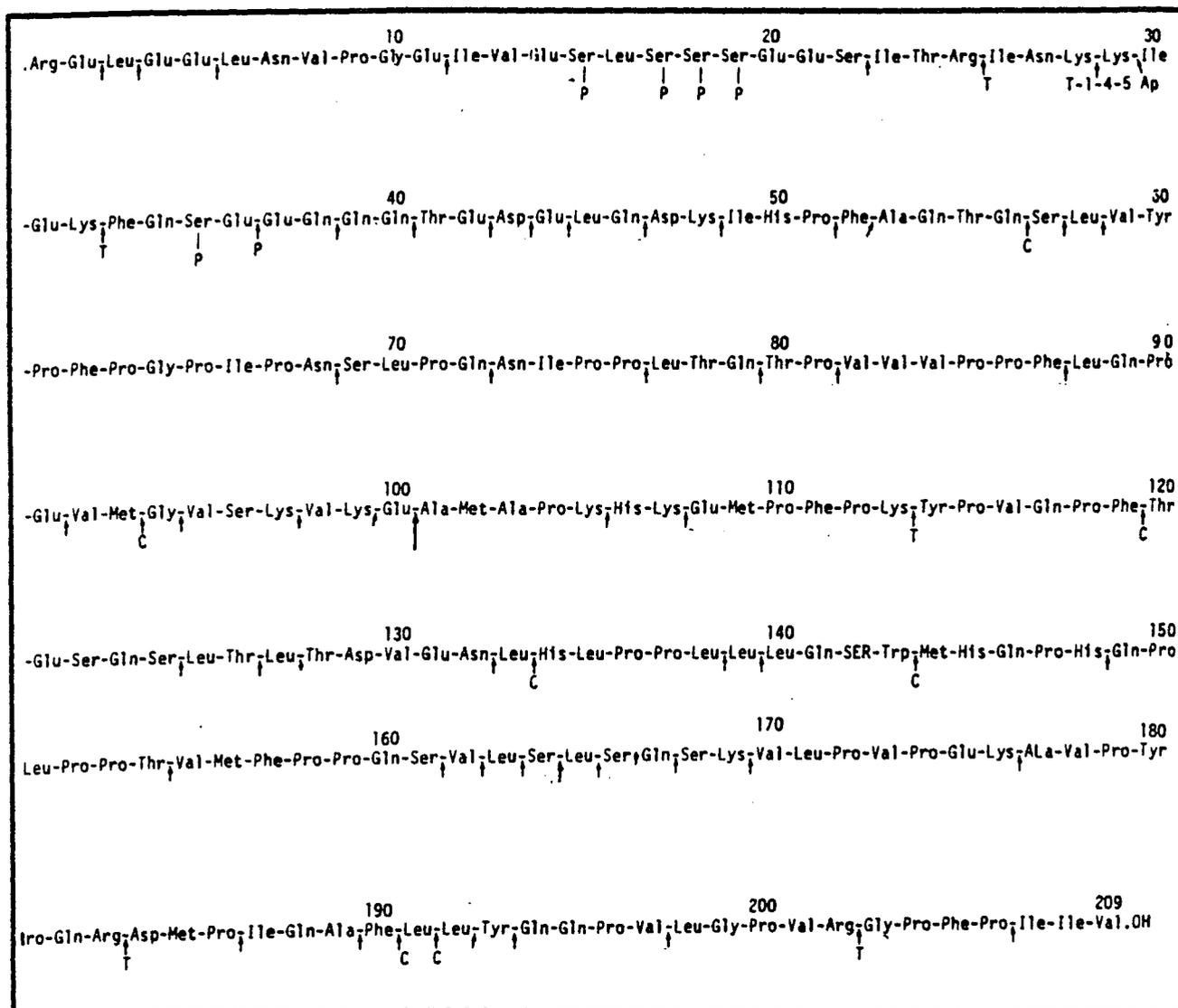


Figure 27. Structure primaire de la caséine β bovine (variant A₂). Les points de coupure des pepsine, trypsine et chymotrypsine sont identifiés (PELLISSIER JP, 1984).

P : Pepsine

T : Trypsine

C : Chymotrypsine

3.5. REPONSES PROLIFERATIVES DE LYMPHOCYTES ET TAUX D'HISTAMINE DE MASTOCYTES CHEZ DES SOURIS "NON CONTAMINEES"

Les résultats de nos premières expériences qui montrent une réponse positive des lymphocytes vis-à-vis de la caséine *in vitro* tant chez les souris recevant de la caséine que chez les souris "contrôle" nous ont conduit à réaliser le même type d'expériences en utilisant des souris "non contaminées" par la caséine. La caséine entière est immunogène ; elle induit la prolifération lymphoblastique *in vitro*. Nous avons cherché à voir si les hydrolysats de caséine obtenus sous l'action des enzymes digestives conservaient cette capacité immunogénique.

Les expériences ont été réalisées chez des souris n'ayant jamais reçu de caséine. Les parents n'ont pas reçu de caséine depuis leur arrivée au laboratoire et les petits ont été élevés avec une nourriture sans caséine à partir de sevrage. Cependant, dans les premiers jours de vie, ils ont été nourris avec le lait de leurs mères.

Sur ces souris non sensibilisées par la caséine et lorsqu'elles ont été âgées de 6 semaines, nous avons répété des expériences semblables à celles réalisées sur les "souris normales". Les souris reçoivent 100 mg par jour de caséine selon le protocole suivant :

- Lot 7 : lot contrôle qui ne reçoit pas de caséine
- Lot 8 : pendant 2 semaines
- Lot 9 : pendant 4 semaines
- Lot 10 : pendant 6 semaines
- Lot 11 : pendant 8 semaines
- Lot 12 : pendant 12 semaines, repos de 15 jours, nouvel apport de caséine pendant 3 jours avant récupération des cellules
- Lot 13 : pendant 20 semaines, repos de 15 jours avant sacrifice.

La réponse proliférative des lymphocytes de souris alimentées en caséine est suivie par TTL avec la méthode décrite dans la partie Matériel et Méthodes (§ 2.4.3.). Les cellules sont cultivées soit, dans le milieu seul (témoin des conditions de culture), soit en présence d'antigènes :

- caséine (C)
- hydrolysat pepsique (P)
- hydrolysat pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC).

De plus, nous avons utilisé la PHA comme témoin positif. Au 3^{ème} jour de culture, avant de mettre la ³H Thymidine, nous avons récupéré 50- μ l de surnageant de culture pour effectuer les dosages des IgG totales et des IgG spécifiques anti-caséine. La figure 29 résume les différentes étapes des manipulations. Les résultats du TTL sont exprimés en indice de stimulation (IS), valeur de l'essai par rapport à celle du milieu seul.

3.5.1. Réponses prolifératives en fonction du temps d'alimentation en caséine

Les résultats obtenus avec les souris "non contaminées", contrôles et ayant reçu de caséine pendant 2, 4, 6, et 8 semaines sont donnés dans les tableaux 18,19,20,21,22. Les résultats des TTL dans ces expériences sont plus faibles que ceux des expériences précédentes réalisées avec des souris "normales" (§ 3.3.). Les réponses des souris recevant des caséines pendant 4 et 6 semaines sont particulièrement faibles et nous avons donc décidé de ne pas utiliser les valeurs de ces deux lots dans notre interprétation ultérieure.

Comme l'indiquent les indices de stimulation représentés sur les figures 30,31,32,33,34, les réponses des souris alimentées en caséine pendant 2 à 8 semaines tendent à être supérieures à celles des "souris-contrôle".

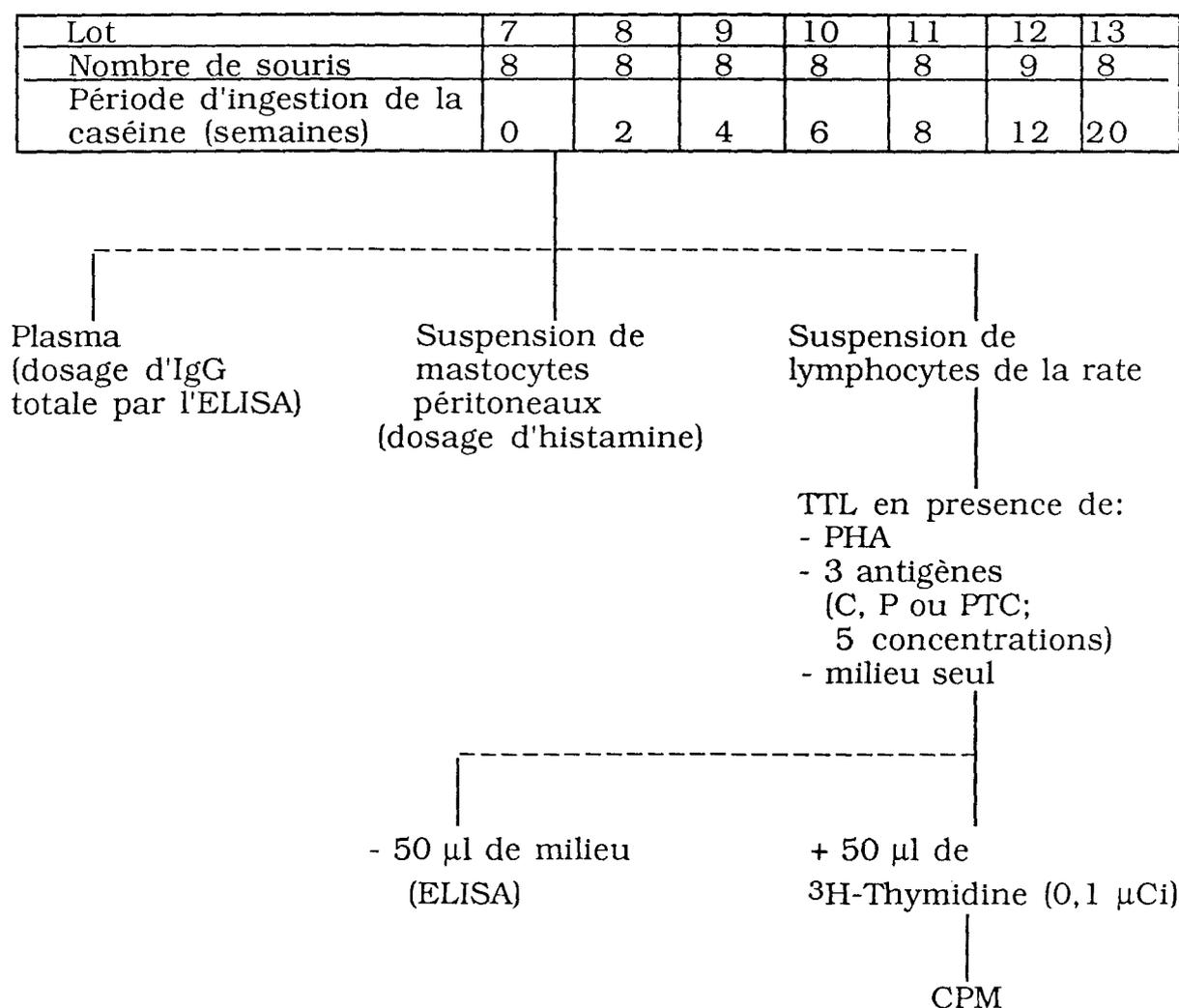


Figure 29. Représentation schématique des expériences réalisées chez des souris "non contaminées"

Après ingestion de caséine, on observe une baisse du nombre de souris qui ont un indice de stimulation inférieur à 1. En effet, dans le lot de souris "contrôles" il existe plus de 60 % de souris dont les lymphocytes cultivés en présence des antigènes incorporent moins de ³H-Thymidine que les cellules cultivées en milieu seul. Tandis qu'après ingestion de caséine pendant 8 semaines ce pourcentage passe à 40 %. Il faut souligner que les réponses des cellules à la PHA se trouvent dans les valeurs normales.

La significativité de l'augmentation d'incorporation de ³H-Thymidine dans les lymphocytes des souris alimentées en caséine a été évaluée statistiquement à l'aide d'un logiciel "statgraph". Les effets des temps d'alimentation différents, des types d'antigènes et des doses d'antigènes sur la réponse lymphoblastique sont analysés par une analyse multifactorielle.

TABLEAU 18 : INCORPORATION DE ³H-THYMIDINE (CPM) DANS LES LYMPHOCYTES DE SOURIS CONTROLES "NON CONTAMINEES" PAR LA CASEINE. LES CELLULES SONT CULTIVEES SOIT EN MILIEU SEUL, OU EN PRESENCE DE PHA OU DES DIFFERENTS ANTIGENES

SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8
Milieu seul	383	170	165	438	130	196	4264	439
PHA	13854	2579	639	2677	12969	9674	6881	4375
C1	331	175	143	118	223	95	3054	301
C2	290	213	203	151	176	138		291
C3	365	205	162	107	173	147	1264	208
C4	249	295	149	160	76	126	1559	604
C5	308	170	135	92	137	119	1482	287
P1	511	425	244	153	202	259	1267	439
P2	300	197	103	118	181	270	1955	551
P3	315	279	148	167	248	266	1576	276
P4	274	141	74	81	111	257	1390	521
P5	235	386	102	112	138	287	1835	322
PTC1	400	206	290	88	122	252	2576	521
PTC2	320	194	95	101	257	392	2462	301
PTC3	300	197	120	105	169	135	2645	289
PTC4	342	166	195	210	136	196	1418	198
PTC5	284	158	121	197	135	283	-	-

C : Caséine entière

P : hydrolysats pepsique de caséine

PTC : Hydrolysats Pepsique - Trypsique - Chymotrypsique

1 : 50 µg/ml

3 : 150 µg/ml

5 : 250 µg/ml

2 : 100 µg/ml

4 : 200 µg/ml

Chaque point représente la moyenne de 4 essais

Les coefficients de variations sont de 9 à 30%

L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que l'alimentation en caséine pendant un temps court (moins de 8 semaines) chez des "souris non contaminées" n'est pas suffisante pour sensibiliser les animaux. Par contre, la consommation prolongée jusqu'à plus de 12 semaines peut établir la sensibilisation.

TABLEAU 19. INCORPORATION DE ³H-THYMIDINE (CPM) DANS LES LYMPHOCYTES DES SOURIS "NON-CONTAMINEES" AYANT INGERE LA CASEINE (100 mg/j) PENDANT 2 SEMAINES. LES CELLULES SONT CULTIVEES SOIT EN MILIEU SEUL OU EN PRESENCE DE PHA OU DES DIFFERENTS ANTIGENES

SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8
Milieu seul	1723	5336	5494	481	1034	698	373	108
Milieu TRIS	2388	4728	2842	787	412	772	494	151
PHA	26719	16521	13108	15551	7417	12720	16048	2117
C1	2962	7786	4155	964	385	944	495	121
C2	2541	5344	3023	884	256	663	339	96
C3	2453	4769	3506	602	213		396	137
C4	1725		3131	746	210	511	616	100
C5	1577	3025	2636	462	182	514	309	94
P1	3030	4767	5324	844	396	1086	623	148
P2	2965	6330	5206	710	243	781	1029	467
P3	2823	4526	4798	676	262		483	104
P4	2876	3422	4006	329	160	324	184	
P5	2672	5304	4375	488	215	465	349	171
PTC1	2492	6954	4396	645	366	873	349	156
PTC2	2919	5521	4855	1185	584	999	-	135
PTC3	2131	4019	4545	643	282	1213	578	147
PTC4	2702	4210	4678	640	275	818	466	154
PTC5	2377	3441	4074	477	206	-	413	105

TABLEAU 20. INCORPORATION DE ³H-THYMIDINE (CPM) DANS LES LYMPHOCYTES DES SOURIS "NON CONTAMINEES" AYANT RECU LA CASEINE (100 mg/j) PENDANT 8 SEMAINES. LES CELLULES SONT CULTIVEES SOIT EN MILIEU SEUL OU EN PRESENCE DE PHA OU DES DIFFERENTS ANTIGENES

SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8
Non	185	548	182	173	135	424	611	4370
Tris	314	595	394	256	228	157	655	3900
PHA	12785	15006	832	3842	4547	2927	13418	13428
C1	289	723	122	142	190	168	649	4020
C2	450	564	520	-	145	156	522	3970
C3	483	580	183	71	148	156	297	2486
C4	238	516	540	126	175	306	741	2727
C5	323	362	251	198	160	124	460	2737
P1	897	721	179	187	286	251	951	3629
P2	437	496	123	61	133	112	590	4016
P3	888	774	189	171	331	212	546	3776
P4	385	407	174	207	191	108	489	3101
P5	351	526	144	127	290	491	567	5736
PTC1	249	517	238	166	278	171	544	3191
PTC2	1294	2476	260	290	300	221	585	5144
PTC3	402	638	146		195	168	507	4005
PTC4	507	594	3347	233	143	478	478	3365
PTC5	372	445	165	87	145	121	444	2922

C : Caséine entière

P : hydrolysats peptiques de caséine

PTC : Hydrolysats Peptiques - Trypsiques - Chymotrypsiques

1 : 50 µg/ml

3 : 150 µg/ml

5 : 250 µg/ml

2 : 100 µg/ml

4 : 200 µg/ml

Chaque point représente la moyenne de 4 essais

Les coefficients de variations sont de 9 à 30%

TABLEAU 21. INCORPORATION DE ^3H -THYMIDINE DANS LES LYMPHOCYTES DES SOURIS "NON CONTAMINEES" AYANT RECU LA CASEINE (100 mg/jour) PENDANT 12 SEMAINES. LES CELLULES SONT CULTIVEES SOIT EN PRESENCE DE PHA OU DES DIFFERENTS ANTIGENES

SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8
-								
Milieu seul	12515	10316	10526	15226	1051	1295	1181	999
PHA	21790	33421	6208	23093	1052	700	1188	1428
C1	22985	17678	14883	29888	1111	1239	2309	1498
C2	20866	21598	13943	24525	972	1083	2227	1565
C3	15545	16655	12287	19484	890	1143	1615	1211
C4	10997	13220	12263	12531	750	1152	997	608
P1	17883	19333	13777	26137	1024	1072	1891	1630
P2	18408	19537	15514	25095	1293	1597	2017	1776
P3	18972	19380	19155	19428	1540	2045	2440	1484
P4	15007	11665	14596	17519	1457	1448	1512	1172
PTC1	19365	16212	10732	24913	989	1239	1841	1666
PTC2	20208	16702	11050	21275	638	1076	1941	1530
PTC3	18705	15308	9706	19067	525	974	1823	1567
PTC4	18746	11715	12415	23303	605	1141	1993	809

TABLEAU 22. INCORPORATION DE ^3H -THYMIDINE (CPM) DANS LES LYMPHOCYTES DES SOURIS "NON CONTAMINEES" AYANT INGERE LA CASEINE (100mg/j) PENDANT 20 SEMAINES. LES CELLULES SONT CULTIVEES SOIT EN MILIEU SEUL (TEMOIN) OU EN PRESENCE DE PHA OU DES DIFFERENTS ANTIGENES

SOURIS	1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin	15246	812	8236	5056	15530	13328	17710	13175
PHA	20577	6924	26905	23515	23567	24773	25318	25651
C1	21041	1585	10040	7076	16427	13978	19818	21251
C2	17681	936	6342	3841	16286	12600	17876	18006
C3	13674	634	3608	2402	10241	7056	20740	18584
C4	7889	398	1536	967	6042	4303	17563	17755
P1	19216	1603	11791	6306	19760	15269	17524	20850
P2	17971	1374	12218	6921	13939	14472	17704	23104
P3	17983	976	10563	5403	15081	13913	18260	21100
P4	15843	976	8930	4935	12334	11368	16246	17977
PTC1	16704	1212	10296	3037	13115	14066	16096	20649
PTC2	16599	807	5196	5623	14070	11617	19569	30639
PTC3	14458	1040	5675	2953	12583	10754	18182	20278
PTC4	14246		5982	3666	14750	9328	19994	20234

C : Caséine entière

P : hydrolysats pepsique de caséine

PTC : Hydrolysats Pepsique - Trypsique - Chymotrypsique

1 : 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2 : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3 : 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4 : 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

Les coefficients de variations sont de 9 à 30%

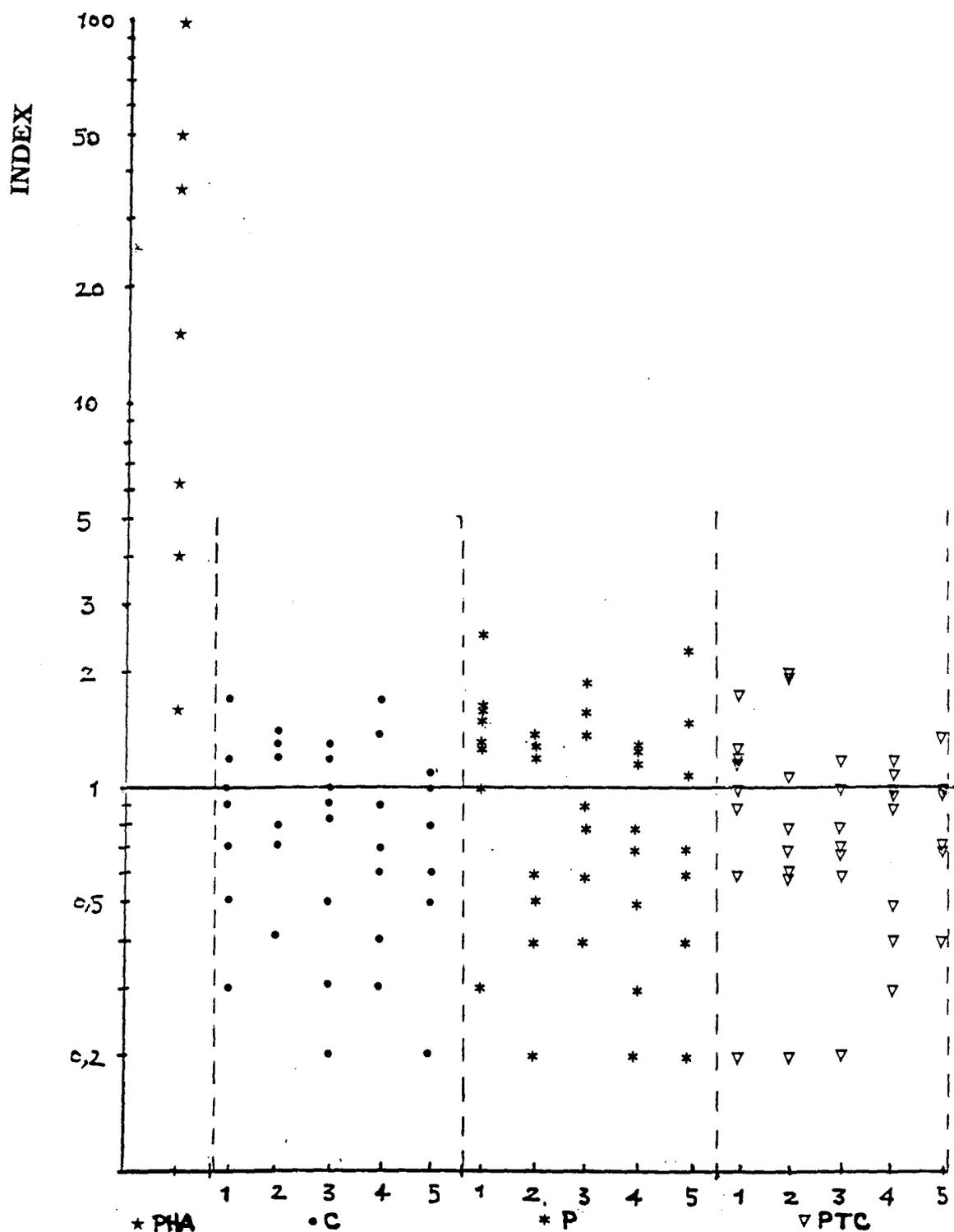


Figure 30. Index de stimulation lymphoblastique des souris "contrôles". Les valeurs sont des rapports d'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes en présence des antigènes sur celles en présence de milieu seul. Les cellules sont cultivées en présence des antigènes : C = caséine entière; P = hydrolysate pepsique; PTC = hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique. 1, 2, 3, 4, et 5 = 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chaque antigène respectivement. Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

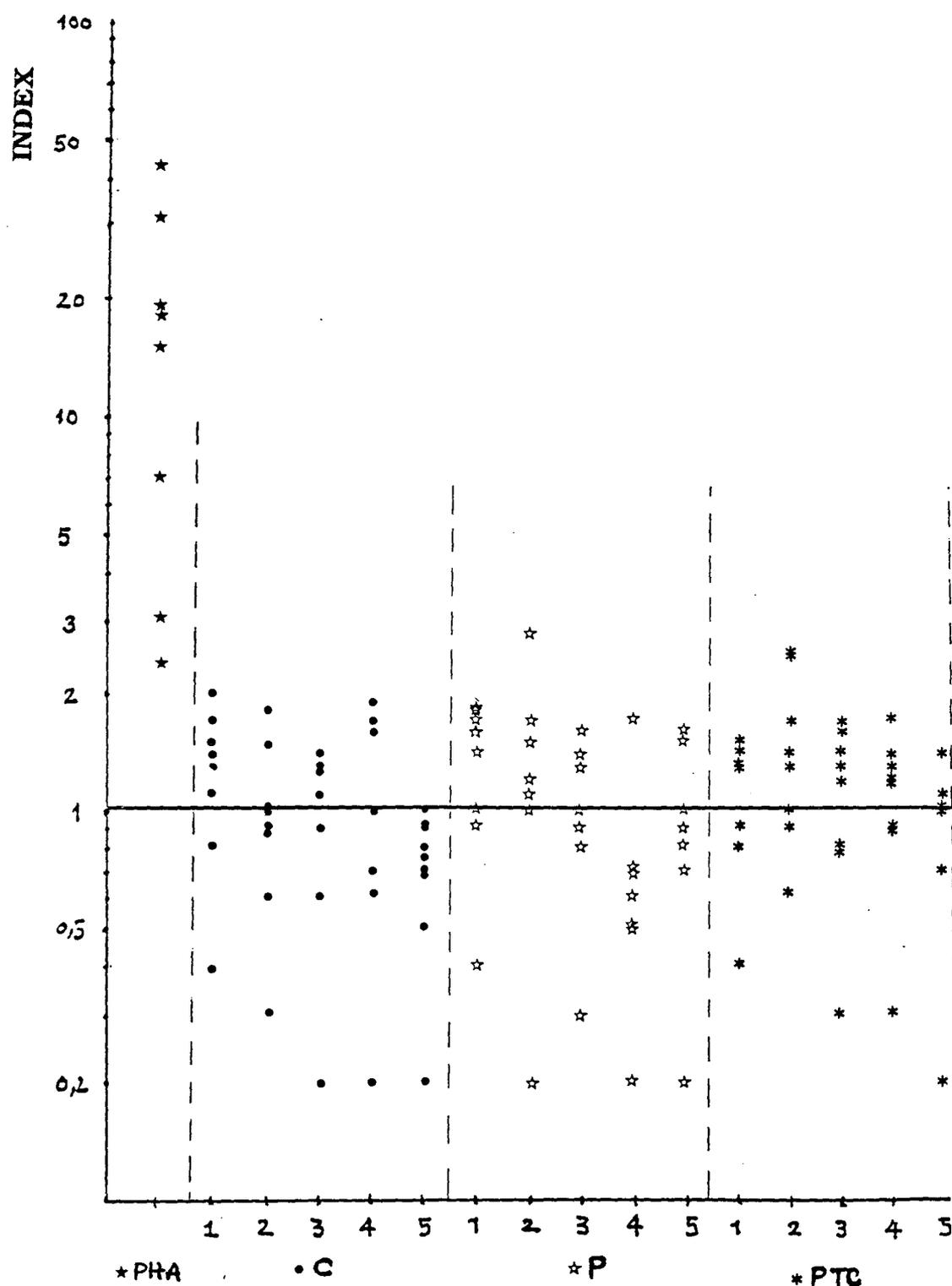


Figure 31. Index de stimulation lymphoblastique des souris alimentées 2 semaines en caséine (100 mg/jour). Les valeurs sont des rapports d'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes en présence des antigènes sur celle en présence de milieu seul. Les cellules sont cultivées en présence des antigènes : C = caséine entière; P = hydrolysate pepsique; PTC = hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique. 1, 2, 3, 4, et 5 = 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chaque antigène respectivement. Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

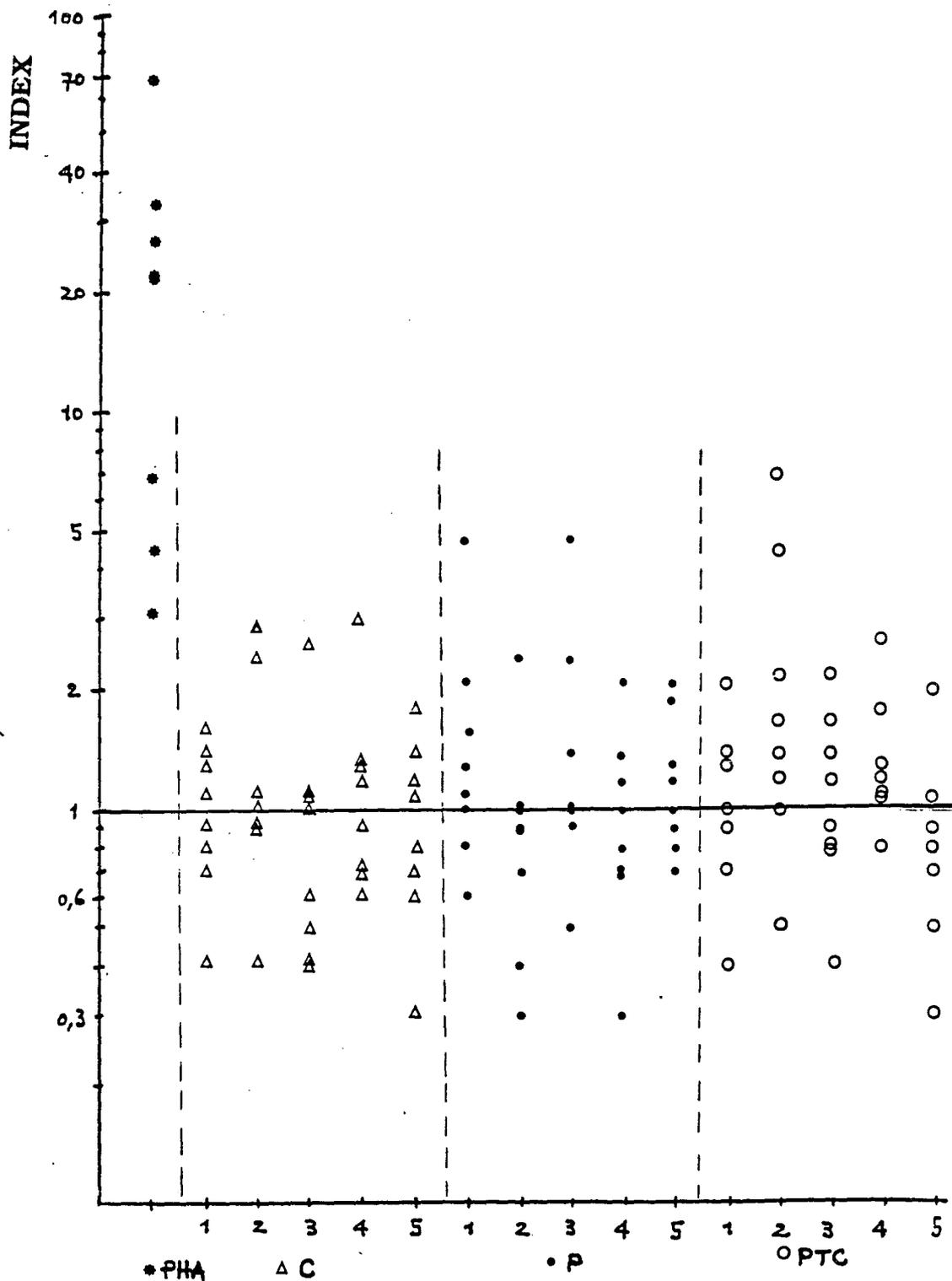


Figure 32. Index de stimulation lymphoblastique des souris alimentées 8 semaines en caséine (100 mg/jour). Les valeurs sont des rapports d'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes en présence des antigènes sur celle en présence de milieu seul. Les cellules sont cultivées en présence des antigènes : C = caséine entière; P = hydrolysate pepsique; PTC = hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique. 1, 2, 3, 4, et 5 = 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chaque antigène respectivement. Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

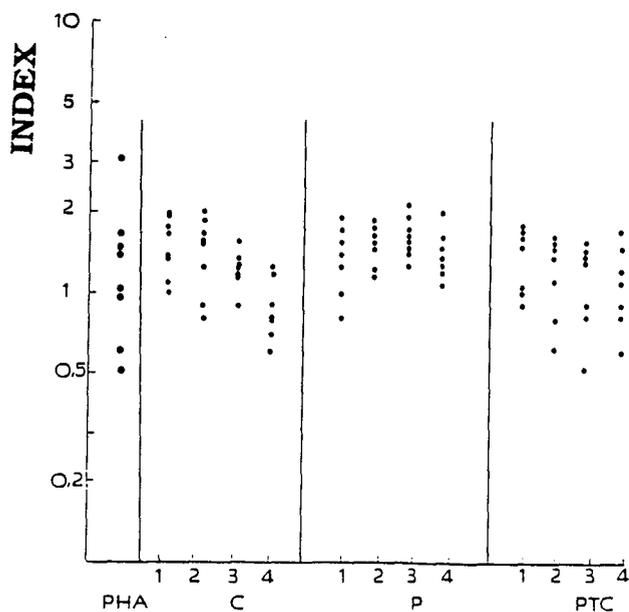


Figure 33

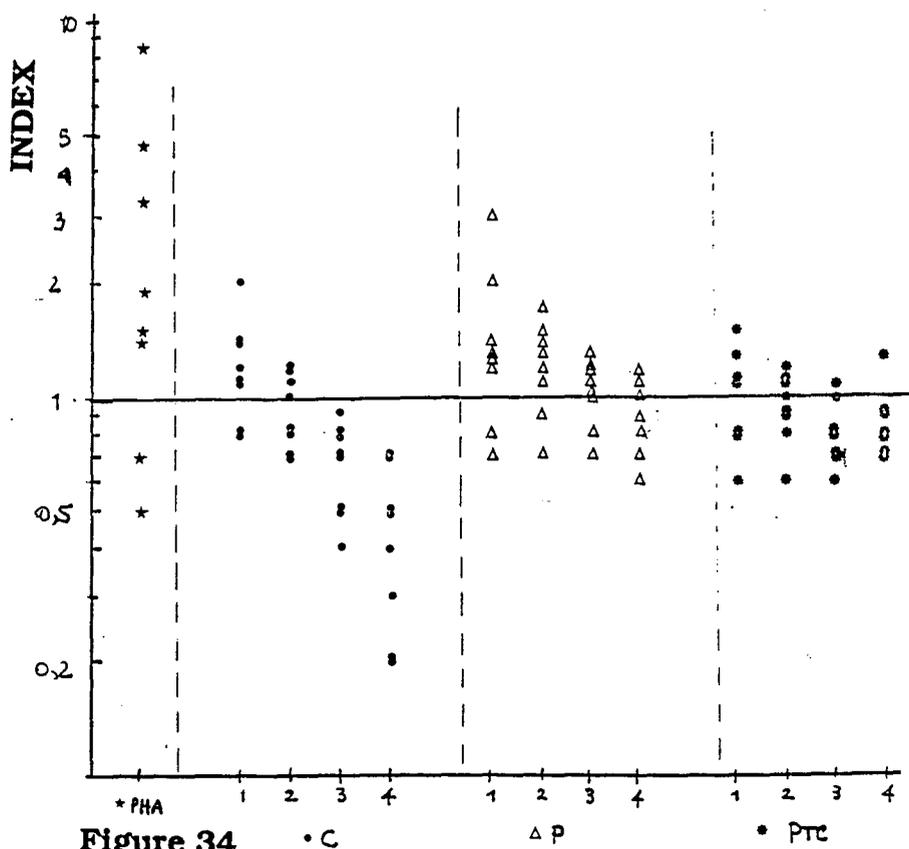


Figure 34

Figure 33, 34. Index de stimulation lymphoblastique des souris alimentées en caséine (100 mg/jour) pendant 12 semaines (Figure 33) et pendant 20 semaines (Figure 34). Les valeurs sont des rapports d'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes en présence des antigènes sur celle en présence de milieu seul. Les cellules sont cultivées en présence des antigènes : C = caséine entière; P = hydrolysate pepsique; PTC = hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique. 1, 2, 3, 4, = 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chaque antigène respectivement. Chaque point représente la moyenne de 4 essais.

Le pourcentage de souris sensibilisées en fonction du temps d'apport de la caséine chez des souris "normales" et des souris "non-contaminées" est résumé dans le tableau 23. Ces chiffres sont calculés à partir du nombre de souris ayant une valeur d'indice de stimulation (IS) supérieure à 1,5. Comme l'indique le tableau 23, il y a une augmentation dans le nombre de souris sensibilisées après apport en caséines pendant 2 et 8 semaines. Ceci étant vrai pour les souris "normales" et les souris "non-contaminées", ce qui indique l'effet de l'ingestion de la caséine chez ces deux groupes de souris.

3.5.2. Réponse proliférative en présence de caséine et de ses hydrolysats

L'analyse statistique multifactorielle des résultats permet de déterminer les facteurs et les doses qui ont une activité significative sur la réponse proliférative.

L'analyse statistique effectuée à partir des résultats obtenus dans le lot de souris alimentées pendant 8 semaines est donnée dans le tableau 24. Il montre qu'il n'y a pas de différences significatives dans les capacités antigéniques de la caséine et des 2 hydrolysats.

De plus, les effets doses de la caséine et des hydrolysats peptiques sont identiques. Cependant, l'effet conjugué de la dose de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'hydrolysat PTC est significativement le plus élevé ($P < 0,01$). Ce tableau nous montre aussi les très grandes variations de la capacité lymphoblastique des souris issues d'un même lot ($F = 14,86^{***}$).

A partir de ces résultats, nous avons décidé d'utiliser une gamme d'antigène de 50, 100, 200 et 300 $\mu\text{g/ml}$ dans les cultures de lymphocytes de souris alimentées pendant 12 et 20 semaines en caséine (lot 12 et 13).

L'analyse statistique des résultats obtenus de lots 12 et 13 par rapport au lot "contrôle" montre que les rapports de stimulation sont significativement plus élevés pour le lot 12. Les résultats sont de nouveau non significatifs pour les lymphocytes de souris ayant reçu de la caséine pendant 20 semaines (figure 35). Il faut souligner que les souris alimentées pendant 12 semaines ont connu une période de 15 jours sans caséine suivie d'un nouvel apport pendant 9 jours avant de les sacrifier. Les souris alimentées pendant 20 semaines ont connu une période de repos de 15 jours non suivie d'un nouvel apport.

Ces résultats montrent également que l'effet prolifératif de la caséine est corrélé de façon négative à la dose. Ceci est vrai à la fois pour les "souris contrôle" et les "souris essai". On ne retrouve pas cette corrélation négative entre la dose et l'activité proliférative lorsqu'on utilise les hydrolysats P ou PTC comme antigènes.

TABLEAU 23. POURCENTAGE DE SOURIS SENSIBILISEES (INDICE DE STIMULATION LYMPHOBLASTIQUE AU DESSUS DE 1,5 QUELQUE SOIT L'ANTIGENE ET LA DOSE), MESURE PAR LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE (TTL).

	Temps d'ingestion des caséines (semaines)							IP(1)
	0	2	4	6	8	12	20	
Souris "normales"(2)	70%	100%*	50%	67%	100%*			12%
n° de souris(3)	12	8	10	9	8			4
Souris "non-contaminées"(4)	9%	23%			21%*	45%*		5%
n° de souris(5)	8	8			8	8	8	

* : $p < 0,05$ (déterminé par la moyenne de l'ensemble de valeurs et par rapport à celles des souris témoin)

1 : Immunisées par voie intrapéritonéale

2 : Souris élevées chez le fournisseur et gardées au régime sans caséine à partir de l'âge de 6 semaines

3 : Les lymphocytes sont cultivés en présence de caséine de 50 ou 100- $\mu\text{g/ml}$

4 : Souris de la première génération provenant de parents gardés au régime sans caséine depuis leur arrivée au laboratoire

5 : Les lymphocytes sont cultivés en présence de caséines, d'hydrolysats pepsique et pepsique-trypsique-chymotrypsique aux concentrations de 50, 100, 150, 200 ou 300 $\mu\text{g/ml}$

En ne prenant que les lots pour lesquels il y avait une réponse significative (lots de souris alimentées pendant 8 et 12 semaines) et en utilisant l'analyse statistique, nous avons essayé d'évaluer l'effet de l'antigène et l'effet dose sur cette réponse positive.

Dans les deux lots, l'effet des trois antigènes utilisés n'est pas significativement différent (figure 36). Ces réponses lymphocytaires identiques vis-à-vis des trois antigènes peuvent signifier que lorsque les cellules sont capables de reconnaître la caséine entière, elles peuvent également reconnaître ses hydrolysats. En clair, le procédé d'hydrolyse des caséines ne détruit pas ses sites antigéniques. De plus, bien qu'il n'y ait pas de différences significatives en ce qui concerne les antigènes, l'effet de l'hydrolysats pepsique est le plus actif.

La figure 37 montre l'effet dose quel que soit l'antigène présent. Il y a une diminution significative ($P < 0,001$) dans la réponse lymphoblastique en fonction de la dose d'antigène, pour les lymphocytes issus des souris du lot 12 (apport de caséine pendant 12 semaines).

TABLEAU 24 :Analyse de variance des indices de stimulation de lots de souris recevant de la caséine pendant 8 semaines.

	DDL	S.C.E	VARIANCE	F
ANTIGENE	2	1.770	0.885	1.93
DOSE	4	3.470	0.868	1.90
BLOC (souris)	7	47.599	6.800	14.86***
INTERACTION				
ANTI.DOSE	8	12.671	1.584	3.46*
ERREUR	98	44.860	0.458	

TOTAL	119	110.370		

MOYENNES DES INDICES DE STIMULATION EN FONCTION DES DOSES D'ANTIGENE

DOSE mg/ml	CASEINE	HYDROLYSAT P	HYDROLYSAT PTC
50	1.0	1.7	1.1
100	1.3	1.0	2.4 ***
150	1.0	1.6	1.2
200	1.4	1.0	1.4
250	1.0	1.2	0.4

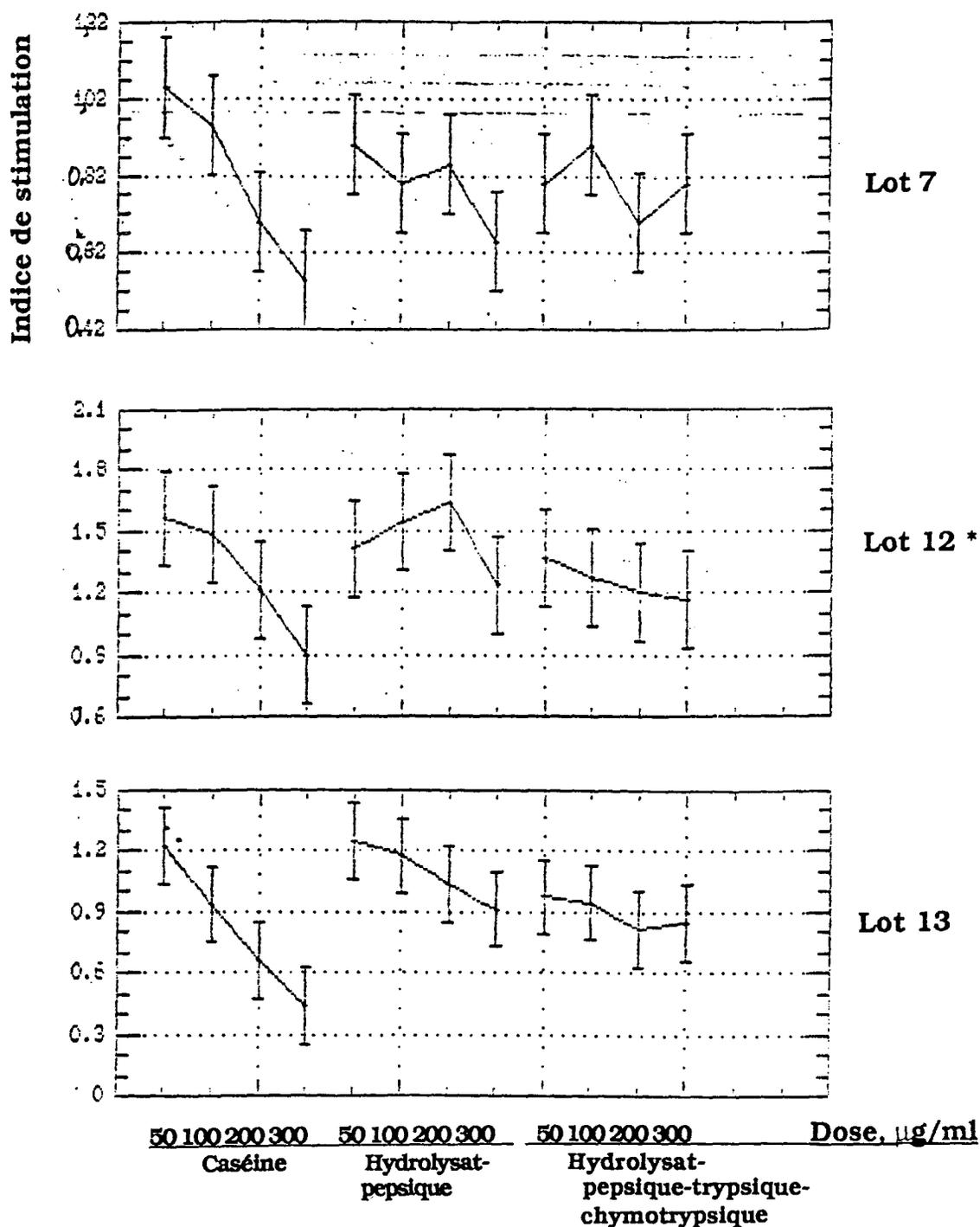


Figure 35. Indice de stimulation lymphoblastique dans les trois lots de souris. Lot 7 : souris contrôles "non-contaminées" (n'ayant jamais reçues de caséine); Lot 12 et 13; souris alimentées en caséine (100mg/jour) pendant 12 et 20 semaines, respectivement.

* : $p < 0,05$

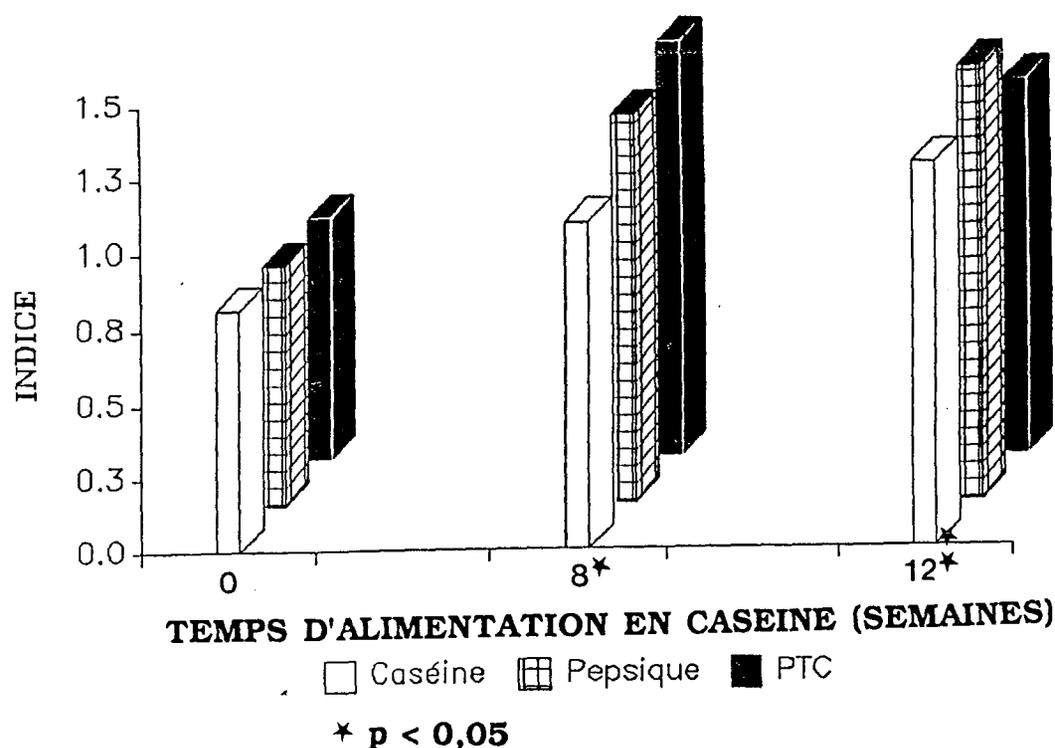


Figure 36. Effet des antigènes sur l'indice de transformation lymphoblastique dans les trois lots de souris "non-contaminées".

Pour savoir plus précisément l'action de chaque antigène et son effet dose sur l'activité proliférative des lymphocytes, nous avons analysé les résultats du lot 12 pour lequel la réponse est significative.

Les résultats sont exprimés en cpm afin de tenir compte des valeurs trouvées pour les cellules cultivées en milieu seul (0 µg/ml d'antigène). Comme le montre la figure 38, la stimulation la plus importante a lieu pour une concentration de 50 µg/ml et ce, quel que soit l'antigène.

Pour la caséine, la diminution de la stimulation est ensuite linéaire en fonction de concentrations croissantes, on arrive même aux valeurs trouvées dans le milieu seul pour la concentration de 300 µg/ml. L'hydrolysate P a une activité en plateau jusqu'à 200 µg/ml. L'hydrolysate PTC répond de façon plus irrégulière. Dans tous les cas, les concentrations élevées aboutissent à la perte de l'activité stimulante des antigènes, ceci quel que soit l'antigène.

3.5.3. Mesure des taux d'IgG totales dans le plasma de l'ensemble des souris et dans les surnageants de cultures de lymphocytes provenant de ces mêmes souris.

Cette expérience a été réalisée pour savoir:

- 1) si l'alimentation en caséine stimule la production d'IgG chez des souris.
- 2) si l'action proliférative de la caséine et de ses hydrolysats peut mener à la production d'IgG par des cellules *in vitro*.

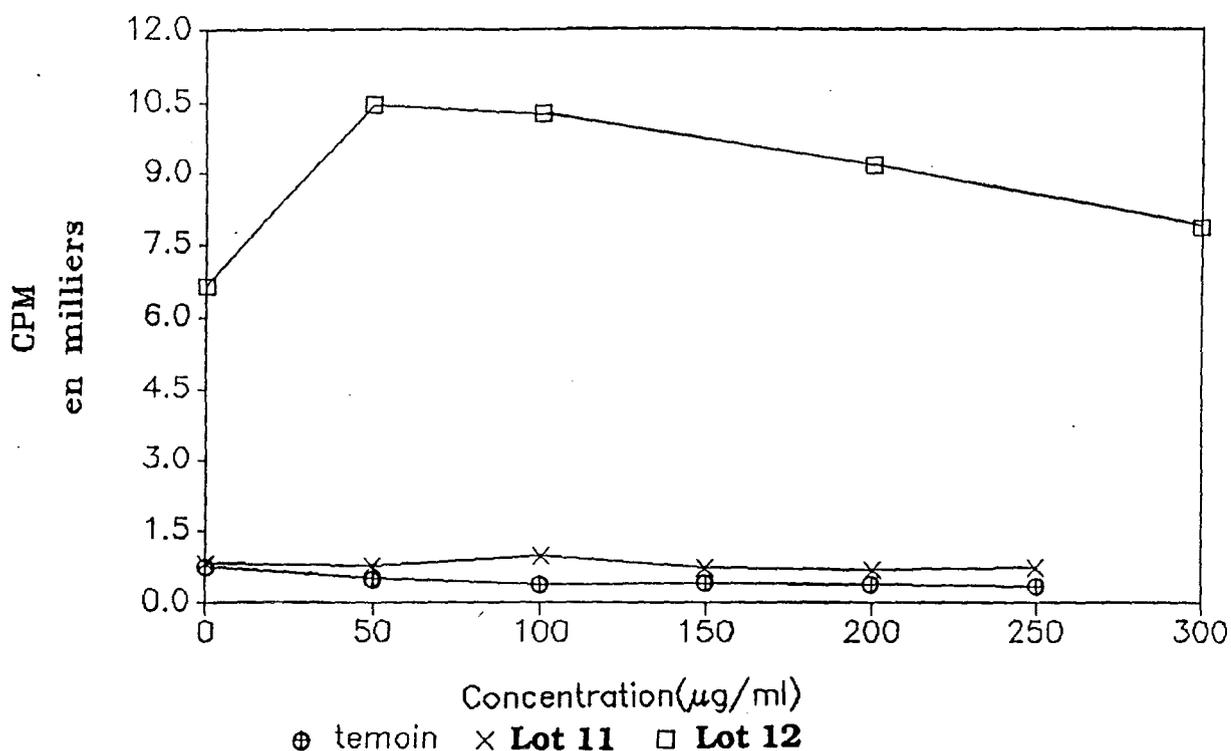


Figure 37. Effet de la dose sur l'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes de souris "non-contaminées" quelque soit l'antigène. Lot 11 et 12 : souris "non-contaminées" alimentées en caséine (100mg/jour) pendant 8 et 12 semaines, respectivement.

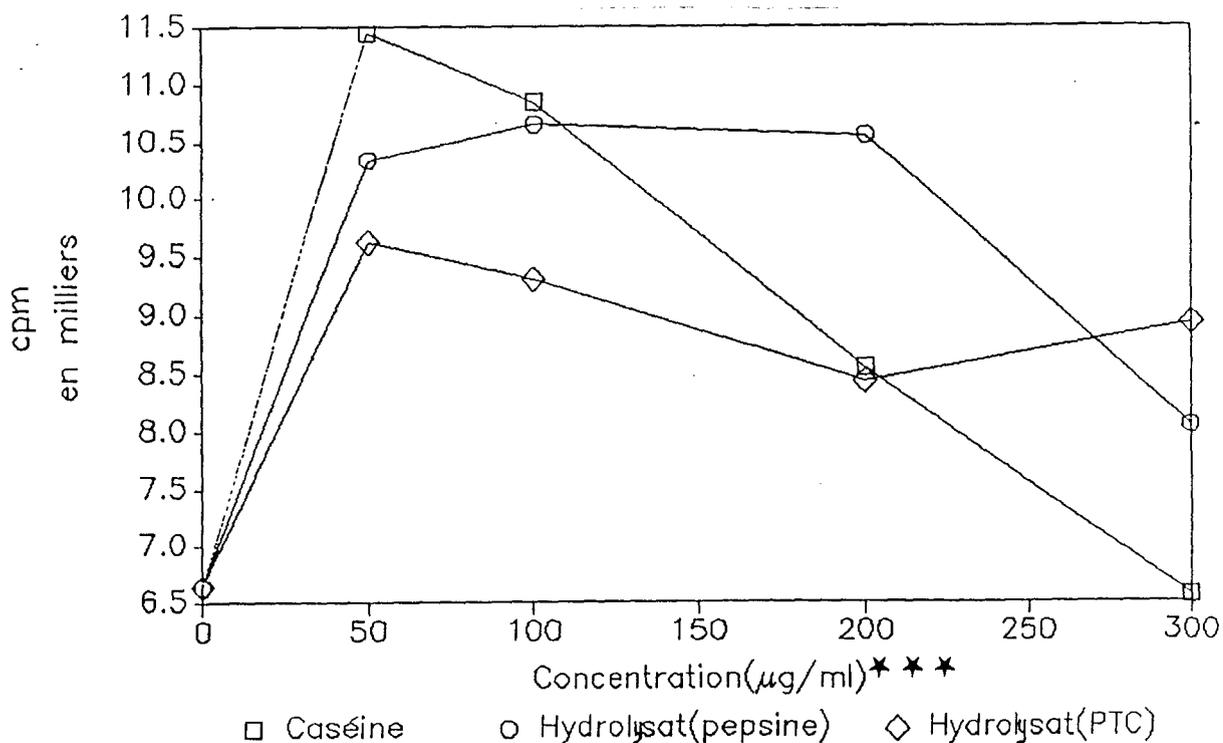


Figure 38. Effet dose sur l'incorporation de ^3H -thymidine dans les lymphocytes des souris "non-contaminées" alimentées en caséine (100 mg/jour) pendant 12 semaines.

Le dosage des IgG totales est réalisé par une méthode ELISA utilisant un immunsérum anti IgG total de souris. On ne teste que les plasmas et surnageant provenant de souris ingérant la caséine pendant 0,4,8,12 et 20 semaines.

Le tableau 25 présente les résultats des dosages d'IgG totales exprimés en densité optique et l'écart type (nombre d'essais : 3). Comme l'indique la figure 39, les IgG sont détectées dans les sérums de souris contrôle et dans celui des souris alimentées en caséine durant des périodes variables. La présence d'IgG est aussi détectée dans les surnageants de cultures de lymphocytes. Les résultats sont identiques que les lymphocytes soient cultivés dans le milieu seul ou en présence d'antigènes non spécifiques ou spécifiques. La quantité d'IgG des surnageants s'élève avec la durée de l'absorption de caséines.

3.5.4. Mesure des taux d'IgG spécifiques anti-caséine dans les plasmas et surnageants de cultures de lymphocytes

Cette manipulation est effectuée pour vérifier si la production d'IgG totale dans les plasmas et surnageants de culture comprend des IgG spécifiques anti-caséine. Pour la mesure de ces immunoglobulines, la caséine entière a été fixée sur les plaques ELISA.

Les résultats présentés dans le tableau 26 sont les absorbances à 450 nm. Les valeurs des blancs sont déduites des valeurs des essais. Ces résultats montrent que l'alimentation en caséine ne stimule pas ou extrêmement faiblement la production d'IgG spécifiques. Les résultats obtenus sur le plasma donnent des valeurs assez élevées pour les "souris contrôle", ce qui peut confirmer que les faibles valeurs obtenues avec les surnageants n'ont pas de signification de cellules sensibilisées.

3.5.5. Mesure du taux d'histamine des mastocytes

Cette mesure a pour but de confirmer les résultats trouvés dans les expériences chez des "souris normales". Nous avons en effet noté l'augmentation du taux en histamine dans les mastocytes de ces souris en fonction du temps d'alimentation en caséine. Nous n'avons pas réalisé le TLAHM car les résultats de ce test dans la première expérience ne se révèlent pas positifs mais nous avons dosé l'histamine.

Comme le décrit la figure 40, il y a une augmentation du taux d'histamine en fonction de la durée de l'apport en caséine. Bien que les mastocytes aient été prélevés et traités de la même façon pour toutes les souris, on observe une variabilité de la concentration en histamine.

Cependant, de ces résultats, il se dégage l'impression que le taux d'histamine croît avec la durée de la prise de caséine. Si on prend l'ensemble des résultats, chaque lot de souris est significativement différent du lot "contrôle" ($p < 0,05$).

Tableau 25: ELISA (450 nm) pour la détection d'IgG dans le plasma de souris recevant des caséines (100 mg / jour) et dans le milieu de culture de lymphocytes provenant des mêmes souris et cultivés en présence des caséines et de leurs hydrolysats.

Animal		L ₇ S ₁	L ₇ S ₂	L ₉ S ₁	L ₉ S ₂	L ₁₁ S ₁	L ₁₁ S ₂	L ₁₂ S ₁	L ₁₂ S ₂	L ₁₃ S ₁	L ₁₃ S ₂
Plasma	DO	0,69	0,71	0,73		0,77	0,76	1,66	0,64	0,49	0,84
	E.C.	0,03	0,05	0,05		0,02	0,01	0,05	0,05	0,12	0,04
M	DO	0,81	0,74	0,78	0,20	1,30	1,47	1,39	1,68	1,58	1,63
	E.C.	0,04	0,06	0,08	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	0,07	0,02
PHA	DO	0,69	0,75	0,45	0,30	1,29	1,44	1,39	1,55	1,39	1,64
	E.C.	0,03	0,01	0,01	0,06	0,01	0,02	0,03	0,11	0,20	0,06
C ₁	DO	0,70	0,76	0,44	0,69	1,38	1,48	1,34	1,71	1,65	1,77
	E.C.	0,00	0,00	0,05	0,26	0,02	0,02	0,07	0,05	0,01	0,07
C ₂	DO	0,74	0,72	0,35	0,85	1,34	1,41	1,40	1,63	1,57	1,77
	E.C.	0,03	0,00	0,07	0,03	0,08	0,05	0,03	0,08	0,02	0,01
C ₃	DO	0,60	0,67	0,33	0,78	1,37	1,46	1,23	1,65	1,65	1,78
	E.C.	0,12	0,00	0,01	0,02	0,01	0,07	0,02	0,08	0,06	0,05
P ₁	DO	0,75	0,72	0,39	0,95	1,34	1,43	1,34	1,75	1,38	1,81
	E.C.	0,00	0,00	0,04	0,06	0,07	0,01	0,12	0,00	0,18	0,04
P ₂	DO	0,65	0,80	0,38	0,93	1,32	1,47	1,37	1,60	1,50	1,70
	E.C.	0,03	0,02	0,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,07	0,07	0,03
P ₃	DO	0,69	0,85	0,48	0,98	1,33	1,50	1,38	1,69	1,62	1,71
	E.C.	0,02	0,02	0,02	0,05	0,04	0,00	0,08	0,08	0,06	0,06
PTC ₁	DO	0,74	0,68	0,41	0,95	1,34	1,45	1,40	1,69	1,64	1,83
	E.C.	0,10	0,05	0,03	0,05	0,03	0,07	0,08	0,04	0,05	0,05
PTC ₂	DO	0,72	0,74	0,38	0,95	1,33	1,38	1,36	1,65	1,70	1,78
	E.C.	0,01	0,08	0,02	0,02	0,07	0,01	0,00	0,05	0,03	0,00
PTC ₃	DO	0,69	0,68	0,38	0,94	1,42	1,46	1,38	1,52	1,72	
	E.C.	0,07	0,09	0,03	0,04	0,05	0,01	0,02	0,12	0,05	

L7, L9, L11, L12, L13: lot de souris alimentées en caséine (100 mg / jour) pendant 0, 4, 8, 12, 20 semaines:

S1: souris n°1

1: 50 ug / ml 2: 100 ug / ml 3: 200 ug / ml

S2: souris n°2

E.C.: écart-type

M: milieu seul

PHA: phytohémagglutinine

C: caséine P: hydrolysat peptique PTC: hydrolysat peptique tamponné

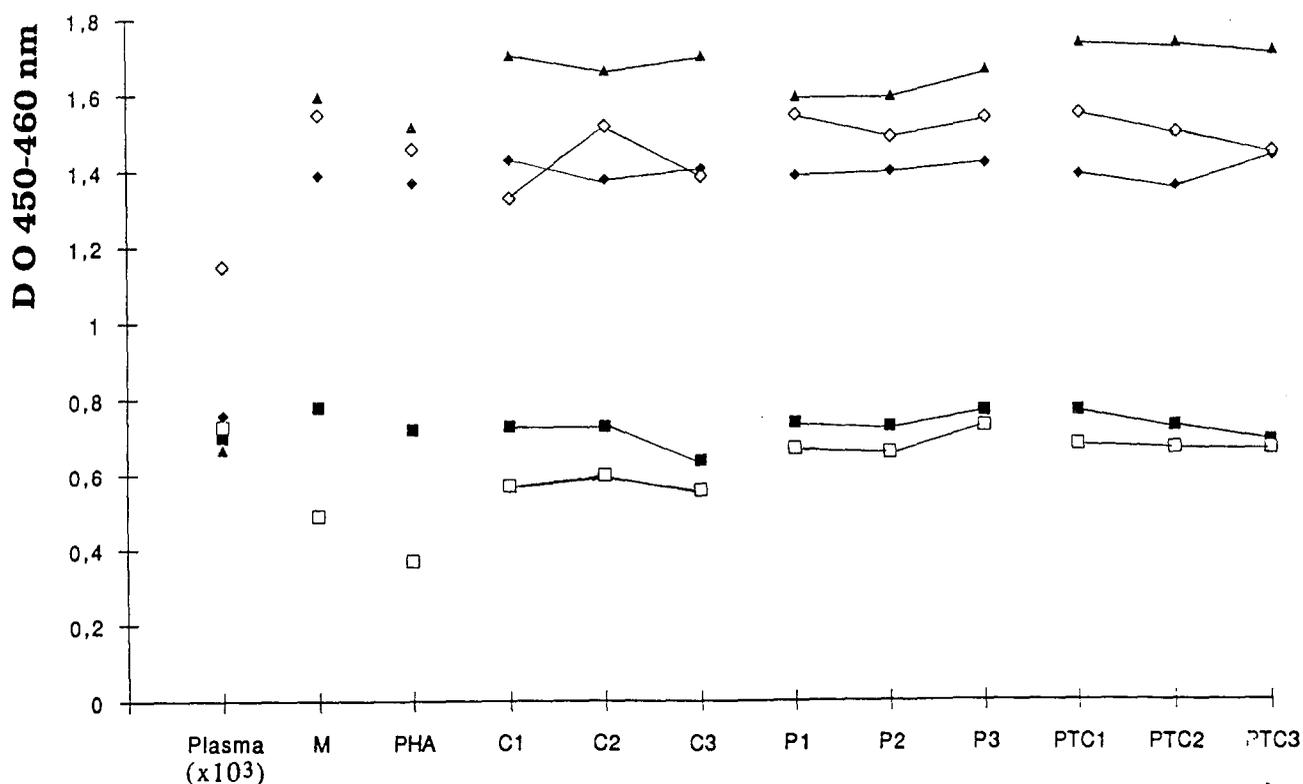


Figure 39. Detection par une méthode ELISA des IgG dans le plasma du sang de souris contrôles et alimentées en caséine (100 mg/jour), et dans les milieux de culture de lymphocytes. Chaque point correspond à la moyenne de 8 essais réalisés à partir de lymphocytes provenant de 2 souris.

□ : contrôles; ■ : souris alimentées 4 semaines; ◆ : souris alimentées 8 semaines; ◇ : souris alimentées 12 semaines; ▲ : souris alimentées 20 semaines.

M : milieu seul; PHA : phytohémagglutinine; C: caséine; P : hydrolysats pepsique; PTC : hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique.

1: 50 µg/ml, 2 : 100 µg/ml, 3 : 200 µg/ml.

TABLEAU 26. MESURE DES IgG SPECIFIQUES ANTI-CASEINE (ELISA, DO 450 nm) DANS LES PLASMAS DE SOURIS AYANT INGERE DES CASEINES (100 mg/jour) ET DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE LYMPHOCYTES PROVENANT DES MEME SOURIS

Temps d'alimentation (semaines)	0	4	6	8
Milieu seul	0,052	0,001	0,010	0,005
PHA	0,053	0,033	0,008	0,011
C ₁	0,032	0,021	0,028	0,014
C ₂	0,021	0,006	0,005	0,044
C ₄	0,024	-	0,005	0,012
P ₁	0,035	0,014	0,002	0,025
P ₂	0,023	0,011	0,016	0,020
P ₄	0,019	0,012	0,011	0,013
PTC ₁	0,025	0,009	0,013	0,004
PTC ₂	0,012	0,007	0,005	0,028
PTC ₄	0,020	0,010	0,005	0,013
Plasma (10 ⁻⁴)	0,144	0,155	0,012	0,054

Les lymphocytes sont cultivés en présence de caséine (C), d'hydrolysat P (P) et d'hydrolysat PTC (PTC)

1,2,4 = 50, 100, 300 µg/ml

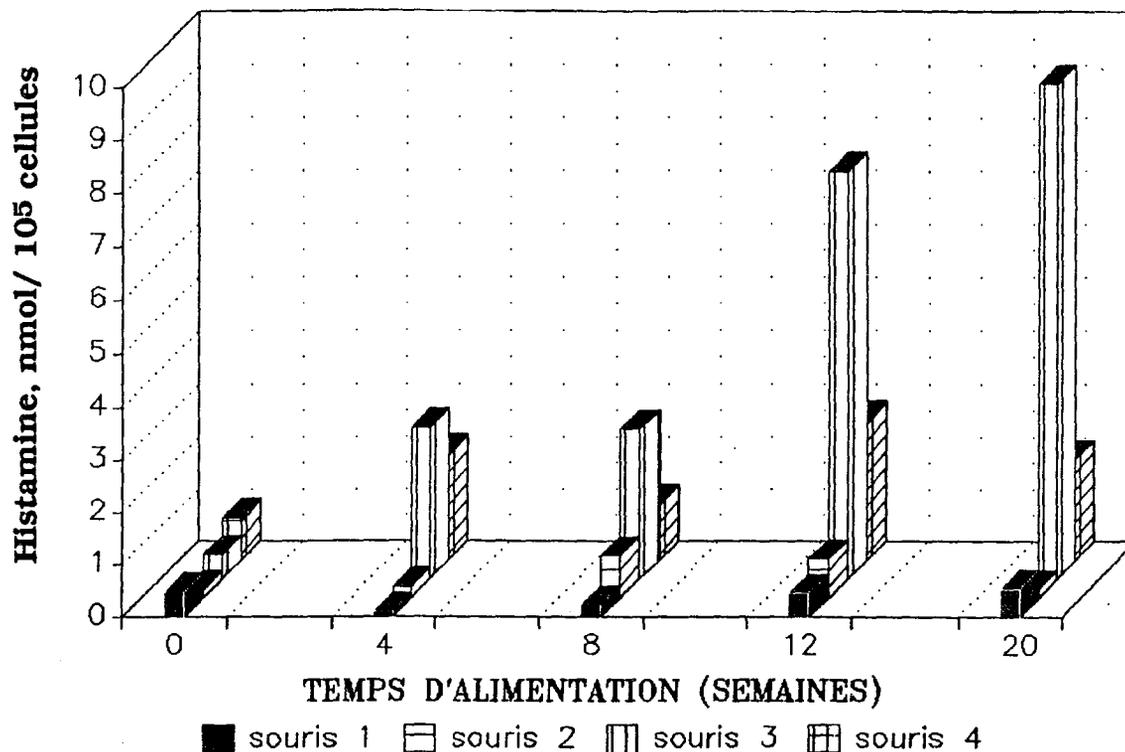


Figure 40. Mesure de l'histamine totale des mastocytes de souris contrôles et de souris alimentées en caséine. Chaque point représente la moyenne de 4 réplifications.

3.5.6. Discussion

3.5.6.1. Effet de l'alimentation en caséine sur la prolifération lymphoblastique

On remarque que l'effet prolifératif de l'alimentation en caséine chez des souris non-contaminées n'est significatif ($p < 0,05$) qu'après 8 et 12 semaines d'ingestion de la protéine. On note, de plus, l'augmentation des IgG totales dans les surnageants de culture de lymphocytes provenant de ces souris mais pas dans les plasmas. L'ingestion de caséine pendant des temps courts (moins de 8 semaines) n'est pas suffisante pour sensibiliser les lymphocytes. Toutefois, l'alimentation prolongée jusqu'à 20 semaines donne un effet inhibiteur sur l'activité lymphoblastique.

Il est admis que la réponse immunitaire à l'antigène alimentaire dépend de la nature, de la dose, de la fréquence d'absorption et du temps de contact de l'antigène (RICCI *et al.*, 1986; MALO et MORIN, 1986). L'ingestion fréquente d'un antigène pourrait induire la réponse de tolérance (HANSON, 1981; STROBEL et FERGUSON, 1984; BRUCE et FERGUSON, 1986b; MOWAT *et al.*, 1987; REVILLARD *et al.*, 1988).

Le degré de la maturation au niveau gastro-intestinal et lymphoïde est connu comme pouvant influencer sur le type de réponse immunitaire contre les protéines alimentaires. Il peut augmenter ou diminuer la production d'anticorps spécifiques. Des études chez des souris ont démontré l'augmentation de la réponse immunitaire chez des nouveaux-nés induite par l'ingestion d'ovalbumine (1 mg/g poids du corps) 2 à 3 jours après la naissance. L'apport de la même quantité d'antigène chez des souris sevrées a développé des réponses de tolérance. Ces réponses immunitaires sont exprimées par les réponses cellulaires ainsi qu'humorales, comprenant la synthèse des classes d'anticorps IgG et IgE (HANSON, 1981; STROBEL et FERGUSON, 1984). Il semble que l'absorption intestinale d'antigène en faibles quantités tende à développer une réponse systémique spécifique. Par contre, l'absorption de grandes quantités mène à la réponse immunitaire de tolérance (STROBEL et FERGUSON, 1984). Le fait que nous ayons trouvé une faible stimulation lymphoblastique chez des souris "non contaminées" alimentées à partir de l'âge de 1 mois et pendant 20 semaines, pourrait être une indication du phénomène de tolérance.

3.5.6.2. Pourcentage des souris qui sont sensibilisées par l'alimentation en caséine

Par ailleurs, dans ces expériences, on observe que l'indice de stimulation lymphoblastique (IS) est souvent inférieur à 1. Ceci indique une incorporation de ^3H -thymidine plus faible que dans les cellules cultivées en milieu seul.

La proportion des valeurs d'IS inférieures à 1 est diminuée en fonction du temps d'ingestion de la caséine. Il existe 60 % de souris avec un $\text{IS} < 1$ dans le lot de souris "contrôle". Après 8 semaines d'alimentation, il ne reste que 40 % de souris non sensibilisées par une alimentation en caséine.

Si on voit le pourcentage de souris sensibilisées ayant la valeur d'indice de stimulation lymphoblastique supérieure à 1,5 on peut remarquer que le chiffre augmente après 2 et 8 semaines d'apport en caséines. Ceci indique que la sensibilisation par la caséine en fonction du temps de l'apport se développe non seulement en nombre de souris mais aussi en force de la réponse proliférative.

DRUGUET et ANDRE (1975) ont montré que 37 % de rats immunisés par l'ovalbumine par voie orale ne répondent pas à l'administration antigénique *in vitro*. Ces réponses négatives sont constatées tout au long de la période d'observation de 40 jours. Il faut noter que les essais ont été faits chez des rats "normaux". L'absence de réponse observée chez des animaux immunisés par voie orale peut s'expliquer, soit par une absence de stimulation antigénique (absorption antigénique trop faible), soit par le manque de sensibilité de la méthode utilisée (petit nombre de cellules circulantes reconnaissant l'antigène), soit parce qu'une ingestion antigénique poursuivie pendant plusieurs jours peut avoir provoqué l'apparition d'une tolérance immunologique envers l'antigène chez certains animaux comme cela a été décrit dans le système humoral

(HANSON, 1981; STROBEL et FERGUSON, 1984, REVILLARD *et al.*, 1988).

3.6.6.3. Signification de la production d'IgG

Le dosage des IgG est réalisé pour évaluer la production de ces anticorps au cours de la culture de lymphocytes activés. Des titres modérés ou élevés des sous-classes d'IgG aux 3 protéines du lait : α -caséine, β -lactoglobuline, α -lactalbumine ont été trouvés chez des adultes présentant les symptômes d'une allergie au lait. Chez ces sujets, l'anticorps IgG anticaséine est plus élevé (BJORKSTEN *et al.*, 1983; AHLSTEDT *et al.*, 1987; EL RAFEI *et al.*, 1989). Les patients ont une réaction de type hypersensibilité retardée médiée par les lymphocytes T (TAINIO et SAVILAHTI, 1987; URBANEK et KEMENY, 1988; TAINIO et SAVILAHTI, 1990).

Dans notre expérience préalable chez des "souris normales", nous n'avons pas trouvé la libération antigénique d'histamine à partir des mastocytes, donc il n'y a pas de production d'IgE. Par contre, nous avons observé une réponse lymphoblastique positive, ce qui est une indication de la reconnaissance d'antigène par les lymphocytes.

La présence d'IgG anti-protéine alimentaire est normale même chez des sujets sains (AHLSTEDT *et al.*, 1987; EL RAFEI *et al.*, 1989). Cependant, des taux élevés ont été observés chez les sujets allergiques aux protéines alimentaires, tant chez l'homme que chez des animaux sensibilisés (URBANEK et KEMENY, 1988; KEMENY *et al.*, 1986; MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1982). Il a été rapporté que les IgG4, chez les sujets allergiques ou chez des animaux sensibilisés pouvaient fonctionner comme une immunoglobuline protectrice qui entre en compétition avec l'IgE (URBANEK et KEMENY, 1988; KEMENY *et al.*, 1986). Toutefois, plus récemment, EL RAFEI *et al.* (1989) ont vérifié le rôle pathogénique des IgE et IgG4 dans l'apparition des réactions allergiques alimentaires immédiates ou retardées. Pourtant cette même équipe vient de publier le résultat de leur travail sur la réponse humorale contre des protéines du lait bovin chez des sujets sains. Ils suggèrent que la formation d'anticorps spécifiques aux protéines du lait peut refléter une réponse humorale normale à la suite de l'exposition à ces protéines (HARRIS *et al.*, 1989).

Le fait que nous ayons observé dans les expériences présentées ci-dessus d'une part, une production d'IgG totales (mais la production d'IgG spécifiques anti-caséine est faible ou nulle) d'autre part, une réponse à la caséine chez les mêmes souris suggère que l'activité lymphoblastique peut refléter uniquement la capacité des cellules sensibilisées à produire des IgG totales. Ceci n'est probablement qu'une réponse humorale normale induite par la caséine. Néanmoins, il y a toujours la possibilité que cette réponse humorale puisse mener à une réaction allergique.

3.6.6.4. Signification de l'activité proliférative des hydrolysats de caséine

Les 3 antigènes utilisés, à savoir, la caséine et ses hydrolysats pepsiques (P), pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC) montrent une capacité égale à induire la transformation lymphoblastique chez des souris. Cela pourrait indiquer que les lymphocytes actifs reconnaissent non seulement la caséine entière mais aussi les fragments résultant de l'hydrolyse enzymatique.

Ces résultats nous conduisent à formuler :

- 1) Au niveau de l'intestin, la caséine pourrait être absorbée, soit sous forme de molécule entière, soit sous forme de fragments résultant de l'hydrolyse par les enzymes digestives. Il serait donc intéressant de savoir quel fragment passe à travers la muqueuse intestinale.
- 2) Les hydrolysats ont montré des réponses positives de la même façon que la caséine, ce qui suggère que l'épitope existe encore dans les hydrolysats pepsique ou pepsique-trypsique-chymotrypsique et qu'ils ont les mêmes capacités antigéniques.

Les petits fragments de protéines pourraient être antigéniques si après l'absorption intestinale, ils se fixaient sur une protéine circulante comme l'héparine dont la taille moléculaire est appropriée à être antigénique.

La transformation lymphoblastique induite par un antigène reflète la réactivité des cellules T sensibilisées au même antigène. Dans le cas des allergènes, il a été confirmé que ce sont les lymphocytes T qui sont spécifiquement stimulés lors de cas expérimentation *in vitro* (CAVAILLON et DAVID, 1987). Cette transformation est donc considérée comme étant une manifestation de l'hypersensibilité (retardée) à médiation cellulaire (CAVAILLON et DAVID, 1987; TAINIO et SAVILAHTI, 1987; WECK, 1988; PAUPE et SCHEINMANN, 1988; TAINIO et SAVILAHTI, 1990).

La spécificité de la prolifération *in vitro* des lymphocytes des individus allergiques en présence de l'allergène correspondant a été récemment établie en observant la prolifération des lymphocytes en présence de l'antigène de "ragweed" (AE), après clonage et reculture des cellules. De plus, il est démontré que ce sont bien des cellules T qui répondent et cela uniquement à l'antigène AE mais pas à l'antigène des ascariens (PHILLIPS *et al.*, 1987; GURKA *et al.*, 1989).

Ainsi, la positivité de la stimulation lymphoblastique mise en évidence dans ce travail reflète sans doute: 1) L'activité spécifique des cellules T vis-à-vis de la caséine. Cependant pour mieux définir la spécificité de la stimulation, il serait intéressant d'étudier la prolifération de clones de lymphocytes sensibilisés par la caséine dans la culture à long terme. 2) Un état d'hypersensibilité à médiation cellulaire. La corrélation étroite entre la positivité du TTL et les symptômes d'allergie au lait a été récemment montrée (VAN SICKLE *et al.*, 1985; ALBANI *et al.*, 1989; TAINIO et SAVILAHTI, 1987, 1990). Ces auteurs montrent que c'est la caséine qui est le plus stimulant. Ils ont suggéré que le TTL est important lors du diagnostic d'allergie au lait.

Toutefois un seul test ne suffit pas pour porter un diagnostic car la manifestation d'allergie au lait peut mettre en jeu l'activation d'autres systèmes immunitaires comme:

- l'augmentation de la production des immunoglobulines G, A, M spécifiques aux protéines du lait;
- la sécrétion du facteur inhibant la migration des leucocytes par les lymphocytes sensibilisés vis-a-vis de la β -lactoglobuline;
- la réduction du complément sérique;
- la baisse du chimiotactisme des neutrophiles;
- la diminution de l'activité non-spécifique des cellules suppressives (TAINIO et SAVILAHTI, 1987; AHLSTEDT *et al.*, 1987; BJORKSTEN *et al.*, 1983; TAINIO et SAVILAHTI, 1990).

Les études de la validité de ces tests immunologiques démontrent que c'est la combinaison du TTL et le dosage d'IgE sériques qui sont les plus précis pour le diagnostic de l'allergie au lait avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 67% (TAINIO et SAVILAHTI, 1987; TAINIO et SAVILAHTI, 1990).

Ces diverses réactions immunologiques rendent difficiles l'utilisation de la classification de réactions allergiques proposée par GELL et COOMB dans l'identification des réactions allergiques au lait. Pour pouvoir mieux définir la manifestation pathologique de l'allergie à la caséine, d'autres dosages immunologiques, décrits ci-dessus, seraient important à réaliser.

La réponse spécifique des lymphocytes T implique aussi la participation d'autres cellules et de divers médiateurs. Les monocytes et les macrophages sont importants dans la présentation de l'antigène ainsi que dans l'élaboration de l'interleukine-1 (IL-1). La cellule T reconnaît l'antigène que lui présente le macrophage. Cet antigène est présenté en association avec une protéine membranaire du macrophage appelée antigène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (CAVAILLON et DAVID, 1987; RIHOUX, 1988; GURKA *et al.*, 1989). Les lymphocytes qui peuvent reconnaître les antigènes (dans ces expériences ce sont les caséines) donnés expriment sur leur surface les récepteurs d'IL-2 (GURKA *et al.*, 1989). La reconnaissance de la β -lactoglobuline par les lymphocytes sensibilisés de souris a été récemment rapportée par l'équipe de TAKAHASHI *et al.*, (1988).

La sous-population de cellules T qui domine la réponse est aussi importante dans la détermination des résultats finaux des réactions immunitaires. Chez les patients allergiques, il a été retrouvé en majorité des clones de cellules T suppresseurs portant les marqueurs CD3 ou CD4 (PHILLIPS *et al.*, 1987; GURKA *et al.*, 1989). Dans ce travail, si les cellules T auxiliaires qui avaient été activées (il y aurait un déficit dans la sous-population de cellules T suppresseurs), la réponse lymphoblastique observée indiquerait donc la première étape dans la manifestation allergique.

Ce phénomène complexe de la réponse proliférative de lymphocytes serait intéressant à étudier pour mieux connaître le mécanisme de la réponse vis-à-vis de la caséine.

3.6. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE

Les résultats des expériences précédentes montrent la capacité proliférative des caséines et de leurs hydrolysats enzymatiques chez des souris "normales" ainsi que chez les souris "non contaminées". Cette capacité est démontrée à partir de lymphocytes de souris ayant ingéré des caséines susceptibles de reconnaître les antigènes *in vitro*. Ceci suggère le passage de la caséine et de ces produits de dégradation à travers la paroi intestinale, ce qui leur permet de devenir des antigènes. Cette hypothèse nous a conduit à réaliser des études d'absorption intestinale de ces substances.

Nous avons choisi la méthode du sac intestinal retourné décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Cette technique, bien qu'étant simple et reproductible (NABET, 1961; BUDDINGTON et DIAMOND, 1989), pose le problème de la limite du temps de travail car la durée de vie des tissus dans ce système est limitée. Une expérience préliminaire a été nécessaire pour s'assurer de la viabilité du tissu durant les manipulations. Cette expérience montre qu'avec la technique utilisée dans la préparation des sacs intestinaux retournés, on a une absorption active par les tissus vivants pendant au moins 60 minutes d'incubation.

Cependant, pour être sûr de travailler dans de très bonnes conditions de viabilité des tissus, les expériences ont été généralement limitées à 30 minutes.

3.6.1. Mise en évidence de la viabilité des membranes intestinales

Il existe plusieurs types de techniques qui permettent de prouver la viabilité des tissus intestinaux. On utilise préférentiellement le test d'absorption de produits chimiques normalement non absorbables, ni métabolisables qui servent de marqueurs de la perméabilité des tissus (SAID *et al.*, 1985; BERNIER *et al.*, 1988; SAID *et al.*, 1988).

Dans nos expériences, nous avons choisi le ^{14}C -polyéthylène glycol (PEG)-4000 comme marqueur. La formation d'un gradient entre la concentration du marqueur dans les sacs intestinaux et le milieu d'incubation nous renseigne sur l'absorption active de la muqueuse (CARTER *et al.*, 1981; SAID *et al.*, 1988). Une autre méthode est l'observation histologique qui fournit des renseignements sur l'état des membranes (WOLF *et al.*, 1964).

3.6.1.1. Cinétique d'absorption du ^{14}C -PEG-4000, de la ^{14}C -caséine et de son hydrolysat pepsique

Cette expérience a été réalisée sur des sacs intestinaux retournés fabriqués à partir du jéjunum ou de l'iléon. Les comptages de la radioactivité du liquide à l'intérieur de l'intestin de plusieurs souris révèlent le passage éventuel des produits marqués. Comme le montre la

figure 41 les passages transépithéliaux dans le jéjunum du ^{14}C -PEG-4000, exprimés en pourcentage d'absorption par rapport au taux de radioactivité totale du liquide extérieur sont très faibles et restent inchangés durant une incubation de 60 minutes à 37°C .

Dans le même temps, on note le passage de la ^{14}C -caséine et de ses hydrolysats pepsiques. Ceux-ci atteignent respectivement 10 et 100 fois l'absorption du ^{14}C -PEG-4000 à 30 min d'incubation (figure 42).

Des résultats similaires sont obtenus avec l'iléon. Le ^{14}C -PEG-4000 ne franchit pas la barrière épithéliale; la caséine passe très peu alors qu'environ 6% de l'hydrolysate pepsique sont passés après 30 min. L'absorption de la caséine est plus faible et celle de l'hydrolysate pepsique est plus importante dans cette partie de l'intestin.

L'absorption mucosale représente le pourcentage de produits marqués retenus dans le tissu du sac intestinal. Cette absorption est exprimée en pourcentage de la radioactivité du tissu par rapport à celle du milieu extérieur.

Comme le montre la figure 43, l'absorption mucosale du ^{14}C -PEG-4000 est faible et ne se modifie pas durant le temps de l'incubation c'est-à-dire 60 min à 37°C . Ceci est vrai pour la section de jéjunum et d'iléon. La rétention de la ^{14}C caséine augmente progressivement de 2,9 à 5,6% en 30 min dans le jéjunum et de 2,8 à 9,7% dans l'iléon. Dans ce dernier cas, la rétention est linéaire jusqu'à 60 min.

3.6.1.2. Mesure des gradients de concentration des produits marqués dans les liquides absorbés dans les sacs intestinaux et dans le milieu d'incubation.

Pour cette expérience, les sacs sont remplis d'un tampon identique à celui du milieu extérieur. Ensuite, les sacs sont incubés dans le milieu contenant en plus le produit à tester (^{14}C -PEG, ^{14}C -caséine et ses hydrolysats P et PTC). La radioactivité du milieu extérieur sera comptée après 30 min d'incubation sur une prise d'essai identique (50 μl).

Les résultats résumés dans le tableau 27 présentent les différents comptages de radioactivité (cpm) des liquides absorbés dans les sacs intestinaux et dans les milieux d'incubation. Pour le ^{14}C -PEG-4000, les rapports des comptages de la radioactivité présente à l'extérieur et à l'intérieur des sacs sont compris entre 20 et 100. Ils sont plus bas pour les trois autres produits. Dans le jéjunum ils sont de 3 à 6 pour ^{14}C -P, 2 à 3 pour ^{14}C -PTC et 4 à 11 pour la ^{14}C -caséine. Dans l'iléon, les rapports sont respectivement de 3 à 20, 1 à 2 et 4 à 11 pour ces trois produits.

Dans cette expérience, l'hydrolysate PTC semble mieux passer la barrière intestinale que l'hydrolysate P et la caséine. Les rapports de comptage de liquide extérieur et intérieur du sac, inférieur à 1, indiquent qu'il y a réellement une absorption active.

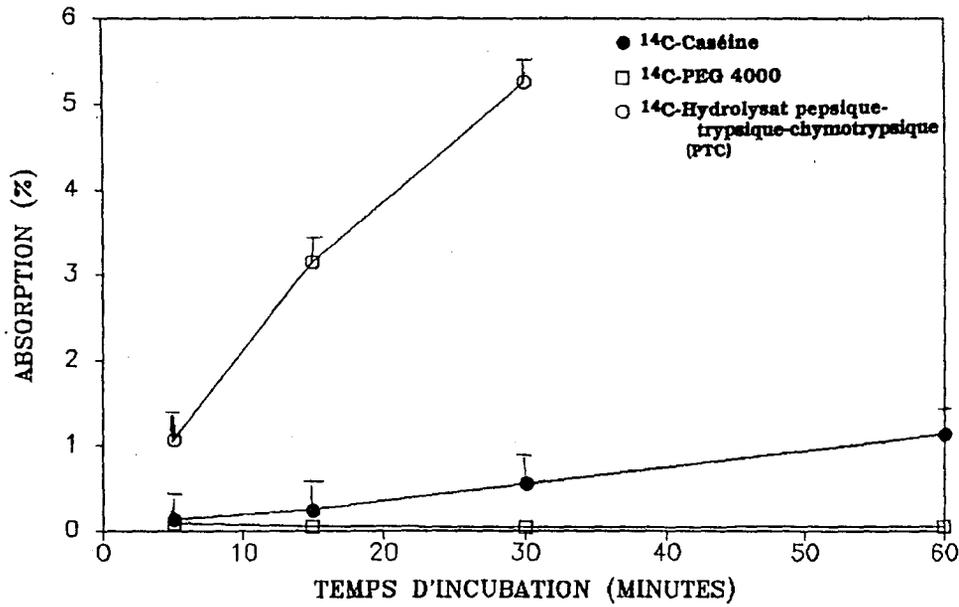


Figure 41. Cinétique d'absorption transépithéliale des jéjunum retournés de souris. Chaque point représente la moyenne de 6 réplifications réalisées à partir de 3 souris.

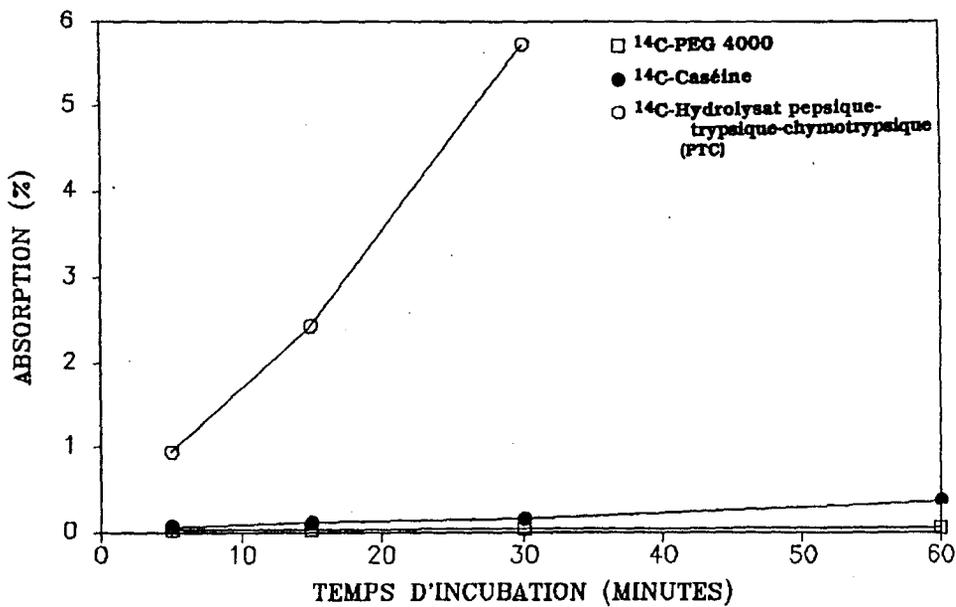


Figure 42. Cinétique d'absorption transépithéliale des iléons de souris. Chaque point représente la moyenne de 6 réplifications réalisées à partir de 3 souris.

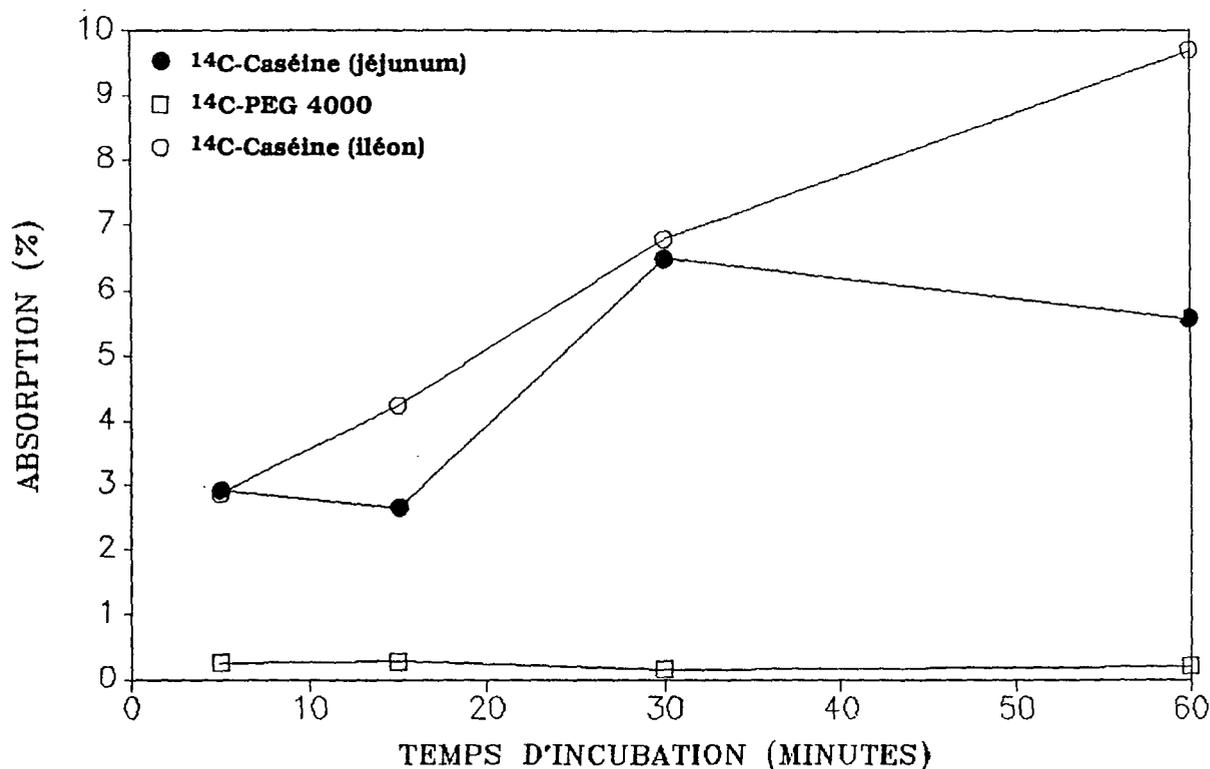


Figure 43. Cinétique de l'absorption par les parois intestinales retournées de souris. Chaque point représente la moyenne de 6 réplifications réalisées à partir de 3 souris.

3.6.1.3. Examen histologique de la membrane intestinale

Les examens histologiques ont été effectués à partir des sections d'intestins : a) non retournés ni traités ; b) retournés et incubés dans le milieu d'incubation (décrit dans le § 2.5.3. de matériel et méthodes) pendant 0, 15, 30 et 60 min. A la fin de l'incubation, les morceaux d'intestins retournés sont aussitôt débarrassés des fils de fermeture et des liquides intérieurs, et fixés dans la solution de fixation. Les fragments non retournés sont fixés tels quels.

TABLEAU 27. COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE DE 50 μ l DU MILIEU EXTERIEUR ET DU LIQUIDE INTERIEUR DES SACS (JEJUNUM ET ILEUM) APRES 30 MINUTES D'INCUBATION A 37°C EN PRESENCE DES DIFFERENTS PRODUITS A TESTER.

Produits	Souris	Milieus extérieur	Jéjunum	Iléon		
		cpm ^a	cpm ^b	Rapport a/b	cpm ^c rapport a/c	
14C-PEG-4000	1	4774	111	43	201	23
	2	7861	70	46	204	38
	3	6463	65	99	85	76
	4	5703	85	67	143	40
14C-P	1	4744	1414	3	201	23
	2	3880	535	7	655	51
	3	3033	1216	2,5	901	3
	4	3644	468	8	546	6
14C-PTC	1	4555	2159	2	1219	3
	2	5045	4782	1	6537	0,7*
	3	4001	3894	1	5004	0,7*
	4	3908	3896	1	5004	0,8*
14C-C	1	5383	1143	4,7	1538	3,5
	2	6827	508	13	524	13
	3	5017	691	7	1069	4,7
	4	6259	466	13	764	8

P : Hydrolysate peptique
 PTC : Hydrolysate peptique-tryptique-chymotryptique
 C : caséine
 * : Existence d'une absorption active

Les photos 1 et 2 de la figure 44 présentent l'état originel du jéjunum et du jéjunum retourné sans incubation. On peut noter que les villosités après retournement sont plus relâchées, mais l'état des cellules épithéliales reste le même. Il faut au moins 30 min de manipulation pour arriver à la formation de sacs à partir d'un intestin retourné. Il est à noter que le temps d'incubation 0 se situe en fait environ 40 min après la mort de la souris.

Les photos 3 et 4 présentent l'état des muqueuses jéjunales après 15 et 30 minutes d'incubation à 37°C. Jusqu'à 30 min, l'état des villosités et les bordures en brosse restent pratiquement inchangés, bien qu'on puisse noter au sommet de celles-ci la présence de cellules dégénératives.

Sur la photo 5 (figure 45) sont présentées les villosités de l'iléon au temps 0. On voit l'intégrité des bordures en brosse. Les photos 6, 7, et 8 donnent l'évolution de l'état des villosités au cours d'une incubation de 60 min. On voit l'intégrité des cellules épithéliales en général malgré une tendance à la dilatation des villosités et à la formation de quelques vacuoles dans les bordures en brosse.

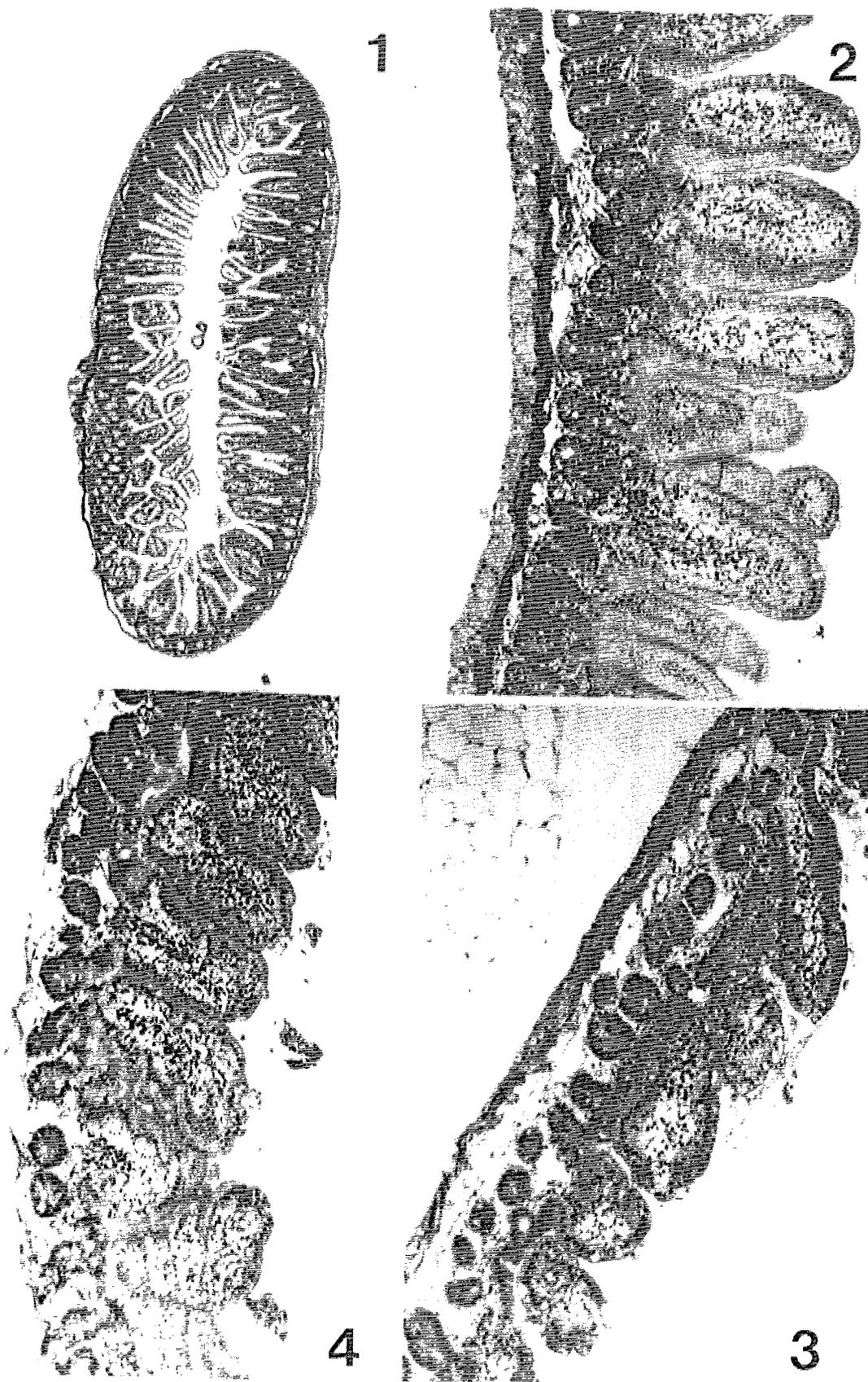


Figure 44. L'état de la paroi et de la muqueuse jéjunale de souris.

1. Intestin non retourné (x 80)
2. Témoin de l'intestin retourné (x 320)
3. Intestin retourné et incubé pendant 15 min (x 320)
4. Intestin retourné et incubé pendant 30 min (x 320)

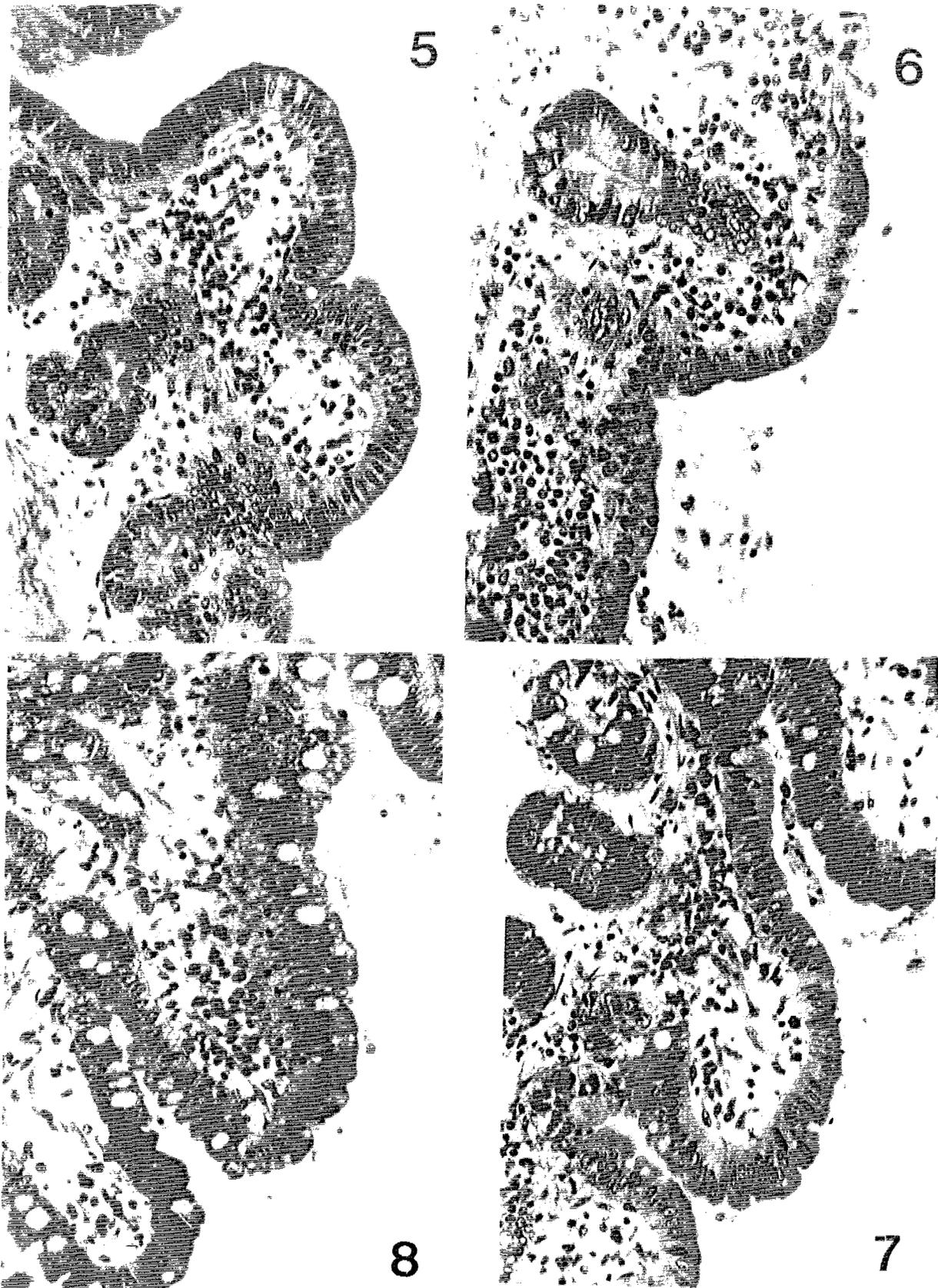


Figure 45. L'état des muqueuses d'iléons retournés de souris au cours de l'incubation.

5. Temps 0 (x 800)

6. Temps 15 min (x 800)

7. Temps 30 min (x 800)

8. Temps 60 min (x 800)

Bien que l'examen histologique indique le bon état des villosités, nous avons volontairement limité le temps d'incubation lors des études d'absorption intestinale à 30 min, pour être certain de travailler avec des tissus vivants (des bordures en brosse non détachées du tissu intestinal).

3.6.2. Absorption transépithéliale et mucoale des ^{14}C caséines et de leurs hydrolysats

3.6.2.1. Absorption transépithéliale

L'absorption transépithéliale représente le pourcentage de la radioactivité passant de la muqueuse à la séreuse du sac intestinal durant l'incubation.

Les résultats d'absorption des trois produits marqués : caséine (C), hydrolysats pepsique (P) et hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC) sont résumés dans la figure 46. On remarque que l'absorption de la caséine dans le jéjunum est la même que dans l'iléon alors que celle de (P) est plus élevée dans l'iléon et que celle de PTC est supérieure dans le jéjunum. Néanmoins, le test statistique ne confirme pas de différence significative dans la capacité d'absorption de l'iléon et du jéjunum pour les trois antigènes.

L'absorption de l'hydrolysats P est significativement supérieure à celle de la caséine (test de Fisher $P < 0,05$, tableau 28). Alors qu'il n'y a pas de différence significative entre l'absorption de la caséine et du PTC.

Il faut souligner que l'hydrolysats P contient des peptides de poids moléculaire plus élevé que ceux du PTC.

3.6.2.2. Absorption mucoale

La mesure de l'absorption mucoale représente le pourcentage de la radioactivité retenue dans le tissu entier du sac intestinal à la fin de l'incubation des sacs en présence des trois produits à tester.

Comme le décrit la figure 47, la fixation de (P) est similaire à celle de la caséine et elles sont plus élevées (iléon) que celle de PTC. Cependant l'analyse statistique ne montre pas de différence significative quel que soit le produit testé ou la partie de l'intestin utilisée (tableau 29).

3.6.3. Effet de la caséine sur la perméabilité intestinale

La présence de la caséine dans la lumière intestinale pourrait influencer la perméabilité des membranes mucoales (BERANT *et al.*, 1988). Nous avons testé l'irritabilité de ces membranes à la caséine par la mesure de l'absorption de ^{14}C -PEG-4000 en présence de caséine.

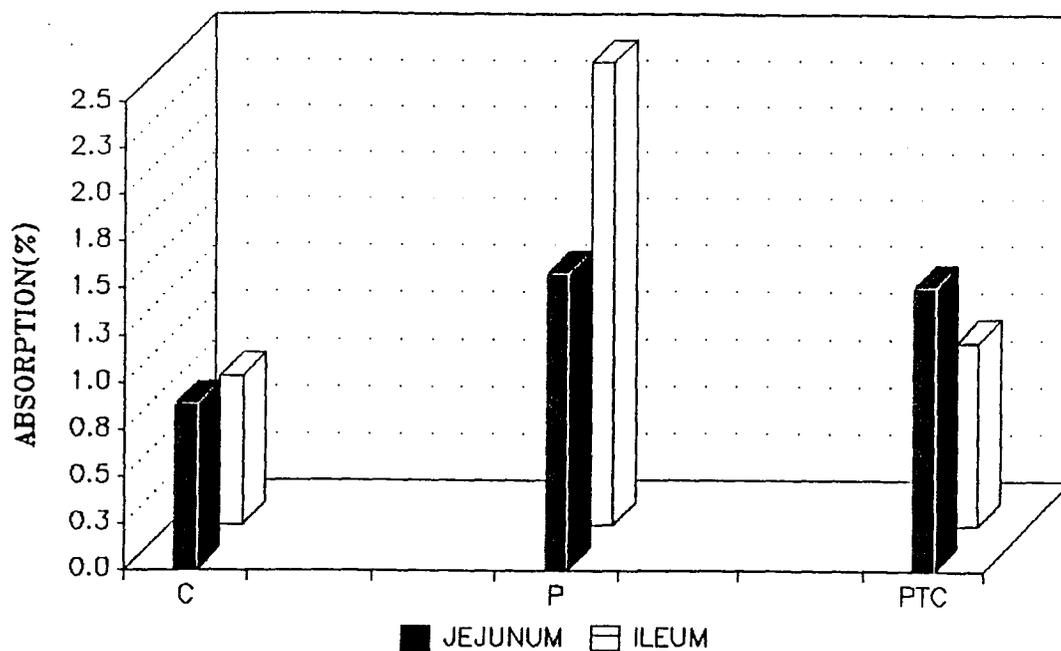


Figure 46. Absorption (%) transépithéliale de ^{14}C -caséine (C) et de ses hydrolysats pepsique (P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC). Chaque point représente la moyenne de 6 réplifications réalisées à partir de 4 souris.

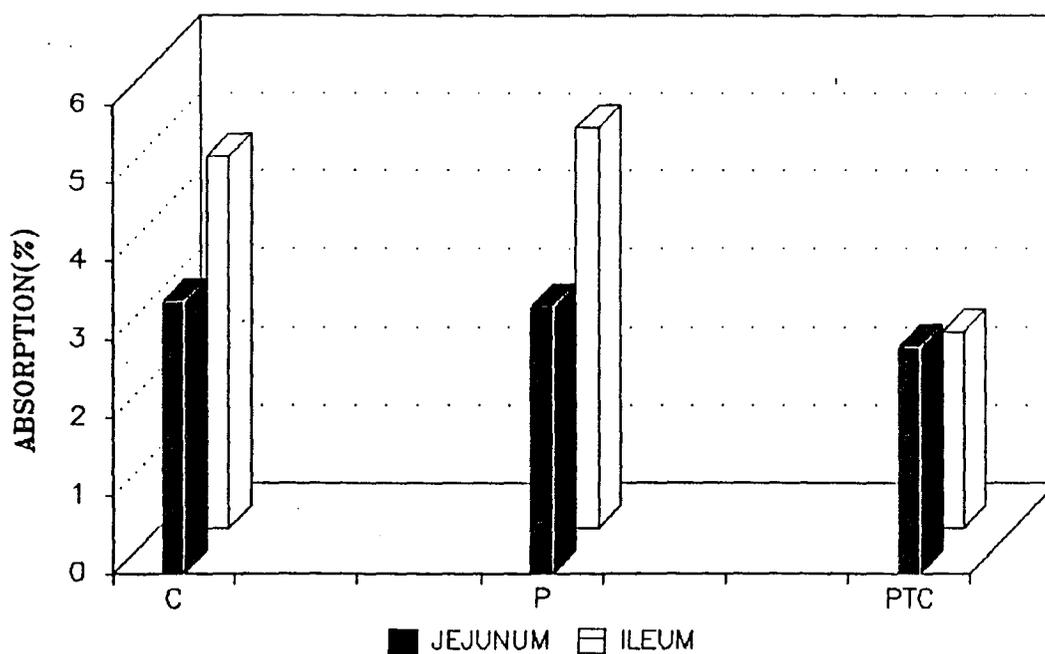


Figure 47. Absorption (%) mucoale de ^{14}C -caséine (C) et de ses hydrolysats pepsique (P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC). Chaque point représente la moyenne de 6 réplifications réalisées à partir de 4 souris.

TABLEAU28: Analyse statistique de l'absorption transépithéliale de la ¹⁴C caséine, de l' ¹⁴C hydrolysate de P et de l' ¹⁴C hydrolysate de PTC

One Factor ANOVA X₁ : Produit Y₁ : Données

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	2	5.828	2.914	2.658
Within groups	21	23.02	1.096	p = .0935
Total	23	28.848		

Model II estimate of between component variance = .309

1

One Factor ANOVA X₁ : Produit Y₁ : Données

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
Group 1 Caseine	8	.846	.361	.128
Group 2 P	8	2.033	1.684	.595
Group 3 P.T.C	8	1.246	.569	.201

2

One Factor ANOVA X₁ : Produit Y₁ : Données

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnnett t:
Group 1 vs. 2 C vs P	-1.186	1.089*	2.567	2.266
Group 1 vs. 3 C vs PTC	-.4	1.089	.292	.764
Group 2 vs. 3 P vs PTC	.786	1.089	1.128	1.502

* Significant at 95%

3

TABEAU 29: Analyse statistique de l'absorption mucosale des trois produits en fonction des différents segments intestinaux

One Factor ANOVA X₁ : SEGMENT Y₁ : DONNEES

Analysis of Variance Table

Source:	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
Between groups	1	4.568	4.568	.882
Within groups	22	113.986	5.181	p = .358
Total	23	118.554		

Model II estimate of between component variance = -.614

1

One Factor ANOVA X₁ : SEGMENT Y₁ : DONNEES

Group:	Count:	Mean:	Std. Dev.:	Std. Error:
Group 1 → Junon	12	3.262	1.651	.477
Group 2 → Leon	12	4.134	2.763	.798

2

One Factor ANOVA X₁ : SEGMENT Y₁ : DONNEES

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD:	Scheffe F-test:	Dunnett t:
Group 1 vs. 2	-.873	1.927	.882	.939

3

Les sacs intestinaux sont incubés dans le milieu d'incubation contenant du ^{14}C -PEG-4000 (1,5 μCi) et des caséines (0,1%). Comme décrit dans le tableau 30, l'absorption de ^{14}C -PEG-4000 reste identique jusqu'à 90 min d'incubation. Nous constatons donc que la caséine n'exerce pas d'activité irritante sur les membranes muco-sales.

TABEAU 30 : ABSORPTION (%) DE ^{14}C -PEG 4000 DANS LE JEJUNUM (JE) ET L'ILEON (IL) RETOURNES, EN PRESENCE DE CASEINE NON MARQUEE

Temps d'incubation	Liquide à l'intérieur du sac		Paroi intestinale	
	Je	Il	Je	Il
30'	0,05	0,10	0,21	0,23
60'	0,08	0,03	0,21	0,09
90'	0,03	0,03	0,12	0,07

Chaque point représente les résultats obtenus avec deux répétitions à partir de l'intestin de deux souris.

3.6.4. Identification des molécules absorbées

3.6.4.1. Electrophorèse et autoradiographie

La combinaison de ces techniques nous permet d'identifier parmi les protéines sécrétées les molécules absorbées par l'intestin. Pour estimer le poids moléculaire apparent des molécules marquées au ^{14}C qui ont été absorbées, nous avons fait migrer sur le même gel des protéines de calibration non marquées dont le poids moléculaire varie de 18000 à 2500 Da.

Les photos des figures 48 et 49 présentent la migration électrophorétique de ^{14}C -caséine, ^{14}C -hydrolysate P et ^{14}C -hydrolysate PTC avant l'absorption. L'électrophorèse est réalisée sur un gradient d'acrylamide de 16 à 28 %. Comme on peut le voir dans cette figure, les poids moléculaires des peptides de ^{14}C -hydrolysate P sont compris entre 8000 et 2500 tandis que ceux de l'hydrolysate PTC sont inférieurs à 2500 Da. Ces derniers ne sont pas révélés par la coloration avec le Bleu de Coomassie. Ces photos montrent également la présence des protéines sécrétées par l'intestin de souris. Ces protéines ou peptides n'apparaissent plus lorsqu'on fait une autoradiographie (figure 49 A et B).

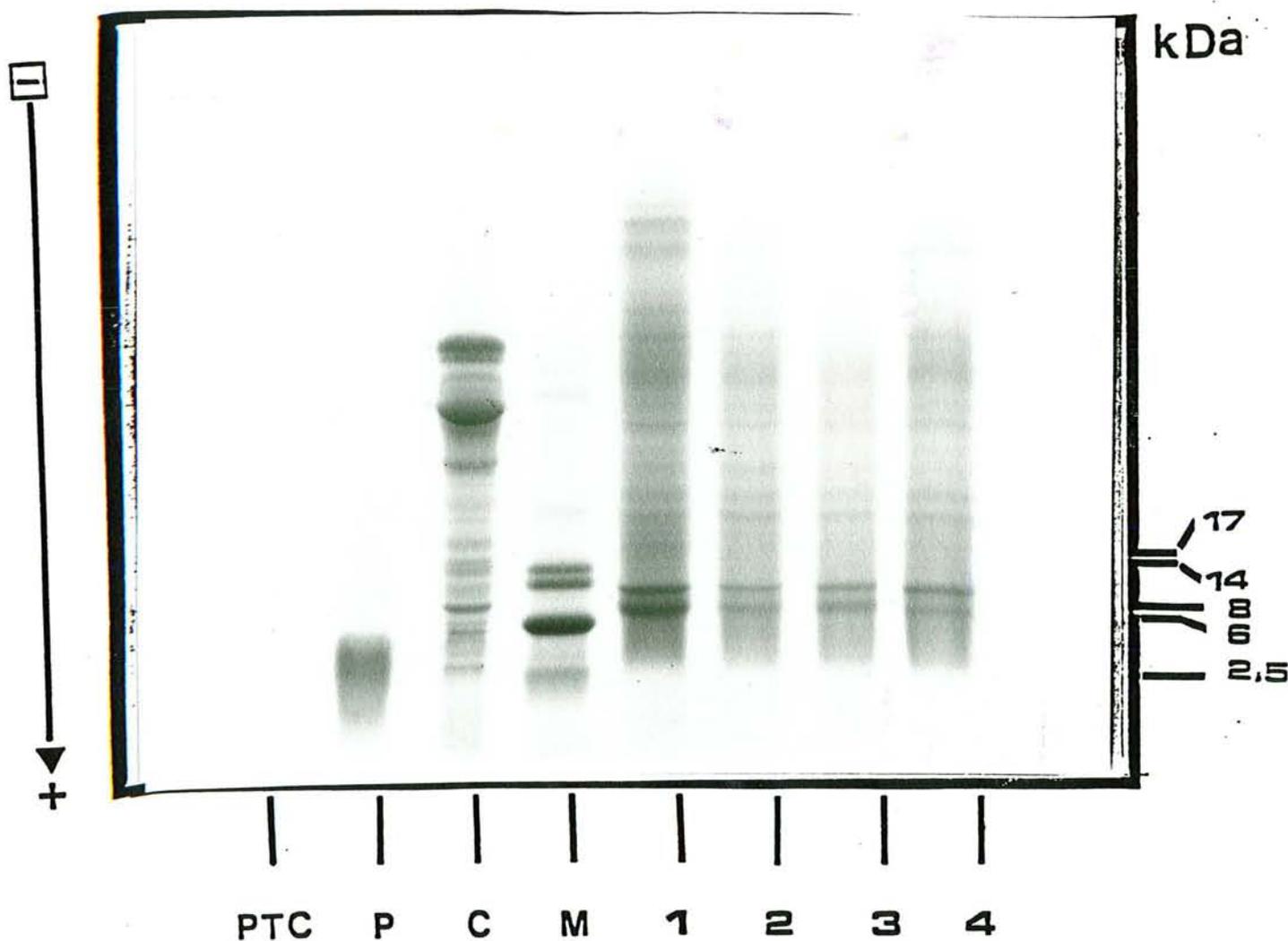


Figure 48. Electrophorèse en PAGE-SDS des ^{14}C -caséines, de leurs hydrolysats P et PTC, et du contenu des liquides intestinaux après incubation en présence d'hydrolysate pepsique (P).
PTC: hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique
P : hydrolysate pepsique
C : ^{14}C -caséine
1,2,3,4: contenu du liquide intestinal, les sacs intestinaux sont incubés en présence d'hydrolysate pepsique.
M : myoglobine et ses fractions marqueurs de poids moléculaire.

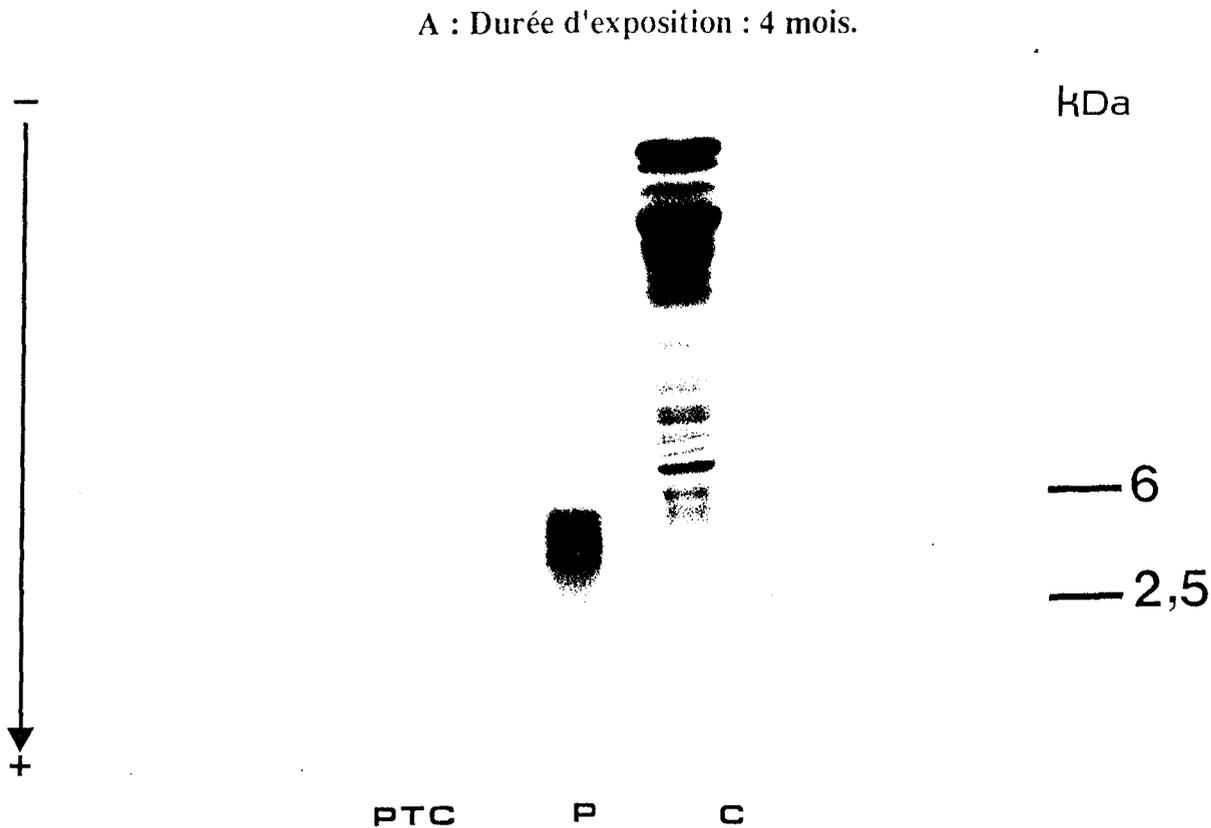


Figure 49. Autoradiographie des caséine marquée au ^{14}C et de leurs hydrolysats P et PTC. Les caséines et leur hydrolysats sont préalablement séparés sur gel d'acrylamide avec un gradient de concentration de 15 à 28 %.

C : ^{14}C -caséine entière

P : Hydrolysats pepsique (activité enzymatique 69 U/mg substrat; pH 2, 37°C, 2 h d'incubation)

PTC : Hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique (activité de trypsine ou de chymotrypsine : 10 U/mg; pH7,4; 37°C; 1 h d'incubation).

Radioactivité des échantillons posés sur le gel; C, P, PTC : 33000, 25000, 21000 cpm/50 μl respectivement)

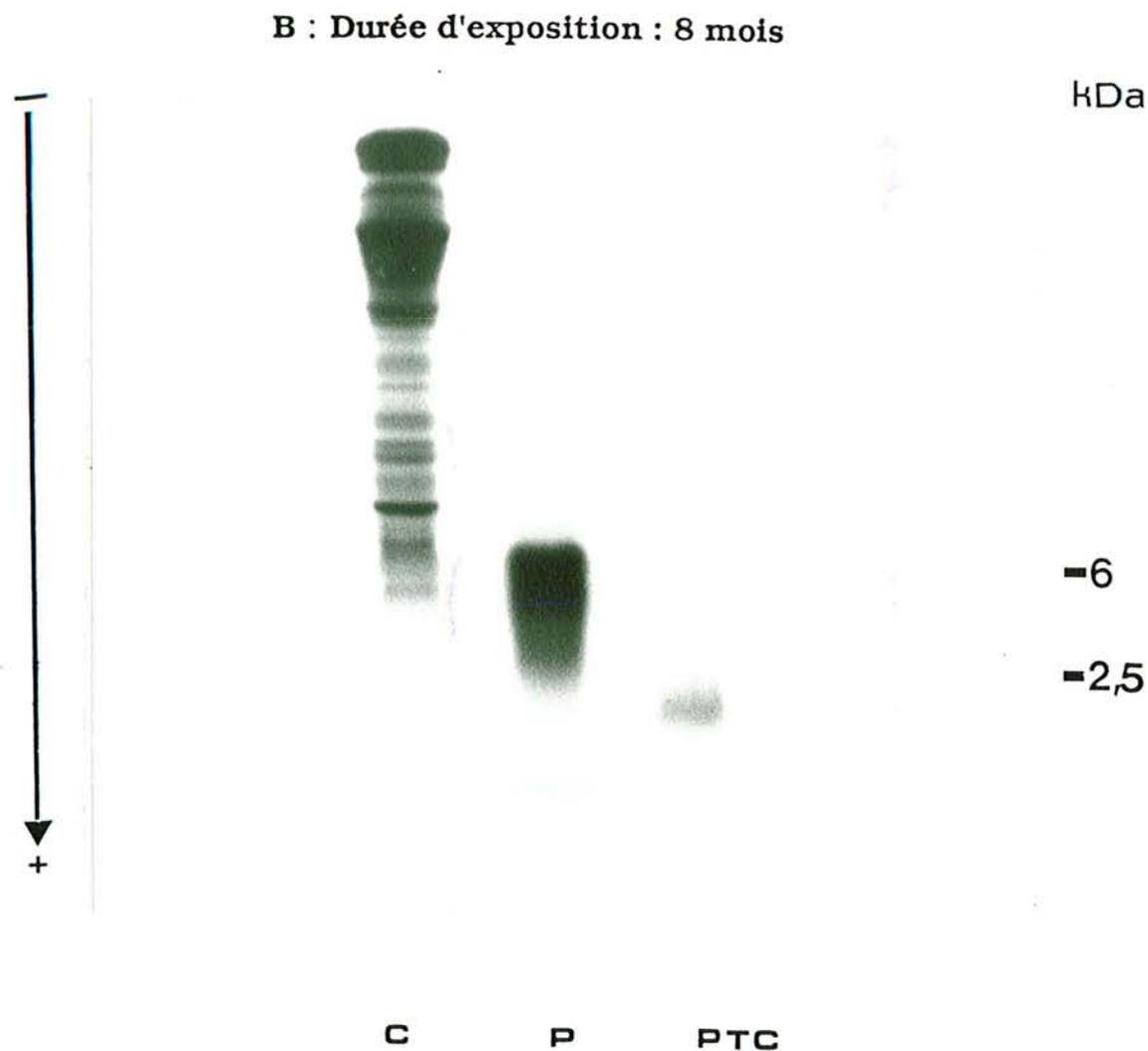


Figure 49. Autoradiographie des caséines marquées au ^{14}C et de leurs hydrolysats P et PTC. Les caséines et leur hydrolysats sont préalablement séparés sur gel d'acrylamide avec un gradient de concentration de 15 à 28 %.

C : ^{14}C -caséine entière P : Hydrolysats pepsique (activité enzymatique 69 u/mg substrat; pH 2, 37°C, 2 h d'incubation)

PTC : Hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique (activité de trypsine ou de chymotrypsine : 10 U/mg; pH 7,4; 37°C; 1 h d'incubation).

Radioactivité des échantillons posés sur le gel; C, P, PTC : 33000, 25000, 21000 cpm/50 μl respectivement)

Grâce à cette technique d'autoradiographie, nous pouvons voir l'absorption des ^{14}C -hydrolysats P par le jéjunum et l'iléon (figure 50). Pour pouvoir développer ces images, nous avons gardé le film à -80°C pendant 8 mois puisque les radioactivités des échantillons déposés sur le gel étaient faibles (environ 1200 cpm/50 μl).

Afin de mieux séparer les peptides, nous avons augmenté le gradient de concentration d'acrylamide du gel (17 à 35%). Dans le même temps, les liquides absorbés par l'intestin ont été concentrés par lyophilisation pour augmenter la radioactivité des échantillons à déposer sur le gel jusqu'à environ 10 000 cpm/50 μl .

La photo de la figure 51 montre l'électrophorèse des peptides absorbés par l'intestin à partir de ^{14}C -hydrolysats P (gradient de concentration du gel de 17 à 35%). On note que ces peptides ont des poids moléculaires autour de 2500 Da. Ce film est développé après 3 mois de contact à -80°C avec le gel d'électrophorèse. L'absorption intestinale des molécules provenant des ^{14}C -caséines et ^{14}C -hydrolysats PTC n'a pas pu être détectée.

Cette technique nous a donc permis de mettre en évidence l'absorption des peptides issus d'hydrolysats P de poids moléculaires environ 2500 Da bien qu'elle ne s'observe pas dans tous les sacs intestinaux testés. Ceci pourrait être dû à la faible radioactivité de l'échantillon déposé sur le gel ainsi qu'à la souris elle-même. Nous avons noté une grande variation individuelle parmi les souris. Les peptides des hydrolysats P et PTC sont mal séparés sur PAGE SDS et cela malgré l'augmentation de gradient de concentration d'acrylamide.

En utilisant la même quantité d'hydrolysats, ils sont mieux localisés sur le gel par IEF (figure 52). Cette figure présente des bandes dérivées respectivement des hydrolysats P et PTC. Si on sépare les peptides radioactifs absorbés par l'intestin par cette méthode, on peut détecter des bandes par autoradiographie. Cependant, cette technique ne donne pas de renseignements sur les masses moléculaires.

3.6.4.2. Ultrafiltration

Ces expériences ont toujours pour but de détecter les poids moléculaires des composés absorbés. Après ultrafiltration avec des membranes à seuils de coupure différents (3000, 6000, 10 000, 30 000), la radioactivité est comptée dans les ultrafiltrats et les réténats. Le tableau 31 montre que les molécules absorbées sont des peptides de poids moléculaire inférieur à 3000 Da.

3.6.5. Discussion

3.6.5.1. Perméabilité et viabilité de la membrane intestinale

La perméabilité et la viabilité de la membrane intestinale sont des facteurs très importants à préserver dans une étude d'absorption afin

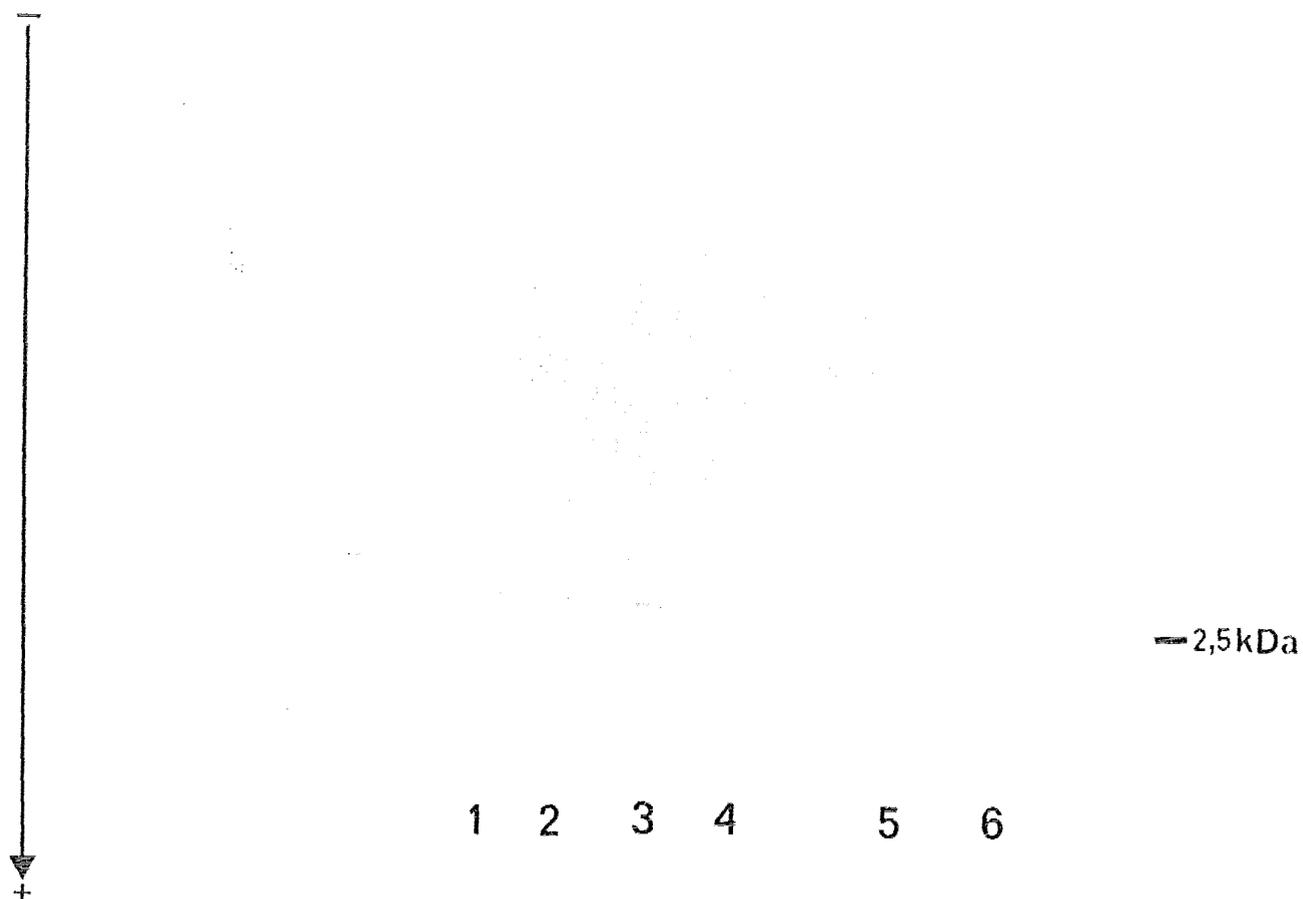


Figure 50. Autoradiographie des peptides issus d'hydrolysat pepsique après absorption par l'intestin retourné de souris. Les peptides sont préalablement séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide avec un gradient de concentration de 15 à 28% en présence de SDS et de 2-mercaptoethanol.

1, 2, 3, 4 : peptides absorbés par le jéjunum

5, 6 : peptides absorbés par l'iléon

La radioactivité des échantillons : 1200 cpm

Durée d'exposition : 8 mois à -80°C

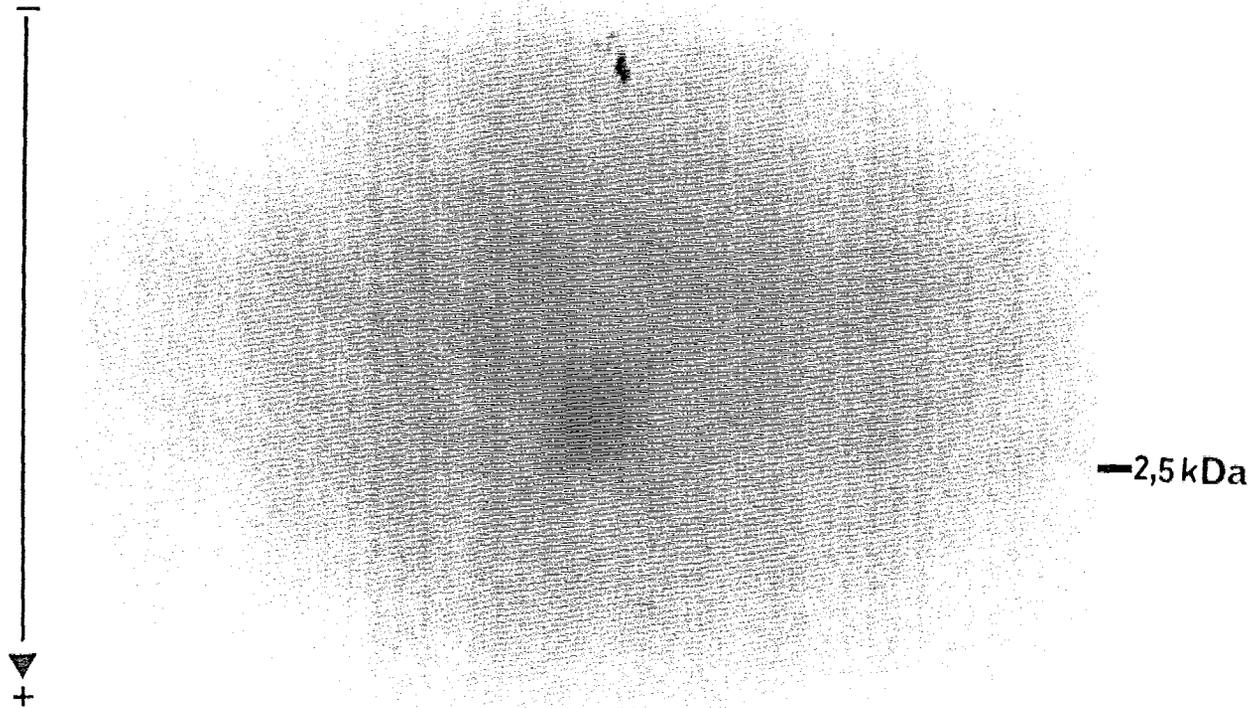


Figure 51. Autoradiographie des peptides issus d'hydrolysat pepsique après absorption par l'intestin retourné de souris. Les peptides sont préalablement séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide avec un gradient de concentration de 15 à 35% en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol.

La radioactivité des échantillons : 10.000 cpm

Durée d'exposition : 2 mois à -80°C

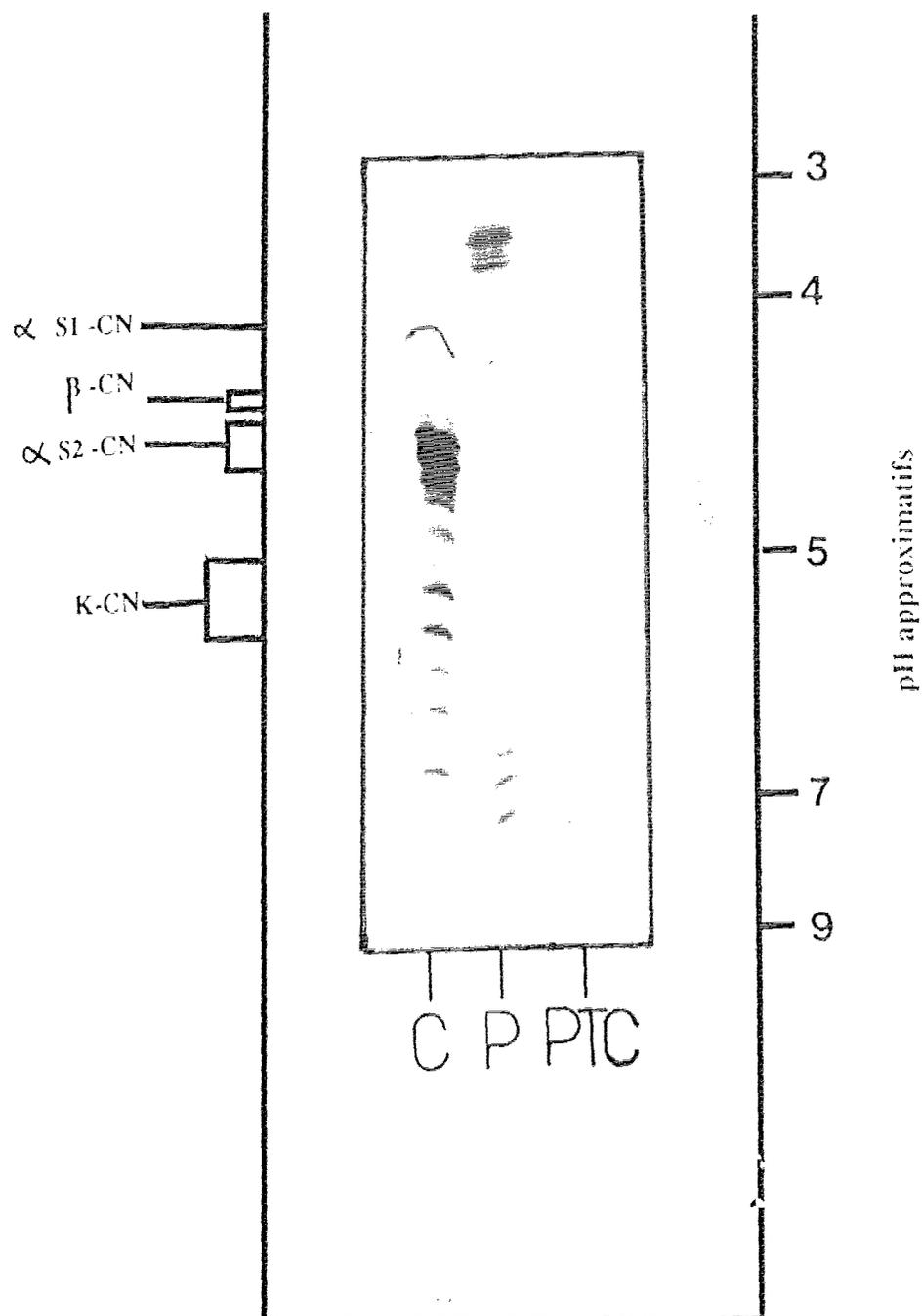


Figure 52. Focalisation isoélectrique des caséines et de ses hydrolysats P et PTC.

C : Caséine entière

P : Hydrolysate pepsique

PTC : Hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique

d'assurer une traversée des molécules dans des tissus vivants. Dans nos expériences, nous avons utilisé pour tester la viabilité des muqueuses : a) l'état histologique, b) absorption du ^{14}C -PEG-4000, c) la présence d'un gradient de concentration entre les substances dans le compartiment séreux et muqueux. Ces résultats confirment une absorption par la muqueuse intacte pendant toute la durée de l'incubation.

La muqueuse intestinale est une barrière infranchissable par presque toutes les grosses molécules alimentaires sauf s'il existe un système de transport approprié. Cependant, elle est aussi une paroi semi-perméable au sens physique du terme car le film des cellules intestinales se comporte comme un film de cellulose. Il laisse passer un certain nombre de molécules de petite taille comme l'eau (0,15 nm), l'urée (0,3 nm) qui sont des substances très diffusibles. On peut établir une liste de marqueurs en fonction de leur perméabilité décroissante. Ce sont le xylose > PEG 400 > mannitol > mannose > EDTA > lactulose et cellobiose (BERNIER *et al.*, 1988).

TABLEAU 31 : RADIOACTIVITE DES ULTRAFILTRATS ET RETENTATS PROVENANT DES LIQUIDES ABSORBES PAR LES FRACTIONS D'INTESTIN ET TRAITES PAR ULTRAFILTRATION.

Produits dans le liquide d'incubation	Seuil de coupure de la membrane	Segments intestinaux	CPM*
^{14}C - Ca	30 000-10 000	Je	143
		Ile	61
	10 000-6 000	Je	41
		Ile	148
	3 000	Je	155
		Ile	447
^{14}C P	10 000-6 000	Je	52
		Ile	53
	3 000	Je	379
		Ile	170
^{14}C PTC	3 000	Je	354
		Ile	330

* Chaque point est une moyenne de deux essais.

La diffusion de molécules de taille très variable est possible car elle obéit à une loi physique simple dépendant de la taille des molécules et de la taille des pores. Le diamètre des pores de la membrane jéjunale a été calculé : il est de 0,4 nm (BERNIER *et al.*, 1988).

De plus, il existe des trous de taille plus ou moins grande dans les espaces intercellulaires (les "tight junction") (BERNIER *et al.*, 1988). LOEHRY *et al.*, (1970), ont étudié des molécules de polyvinyl-pyrrolidone (PVP) de poids moléculaires croissants de 60 000 à 33 000 Da, et ont observé que même de grosses molécules pouvaient diffuser, mais le

coefficient de diffusion diminue alors très rapidement en fonction de la taille.

Par ailleurs, les lésions de la muqueuse en particulier lorsque de nombreuses cellules sont endommagées, créent autant de trous qui permettent le passage d'un plus grand nombre de molécules et des molécules plus grosses. Ces troubles de la perméabilité sont observés notamment dans la maladie coeliaque (UKABAM et COOPER, 1984). Dans ce travail, l'observation des coupes histologiques montre que les muqueuses des sacs intestinaux ne présentent pas de lésions.

L'équipe de SAID *et al.*, (1985;1988) a proposé un test de viabilité des sacs intestinaux retournés par mesure de l'accumulation du substrat testé contre un gradient de concentration (exprimé sous forme d'un rapport des concentrations dans les compartiments séreux (S) et muqueuse (M)). Le sac intestinal est considéré viable si le rapport de S/M est supérieur à 1. Pour réaliser l'accumulation contre un gradient de concentration, la même quantité de substrat est ajoutée dans les compartiments séreux (intérieur du sac) et muqueux (milieu d'incubation). A la fin d'une incubation de 30 min, le rapport S/M est déterminé. La méthode que nous avons utilisée pour tester le gradient de concentration est une adaptation de celle de METLER *et al.*, (1988), proposée par CARTER *et al.*, (1981). Les substrats n'ont été ajoutés que dans le compartiment mucosal. Cependant, après 30 min d'incubation, il n'existe pas d'équilibre des concentrations des deux compartiments. Par contre, on observe quelques gradients de concentrations de $S/M < 1$ (tableau 26).

3.6.5.2. Absorption transépithéliale des ^{14}C -caséine ($^{14}\text{C-C}$), de ^{14}C -hydrolysat P ($^{14}\text{C-P}$) et ^{14}C -hydrolysat PTC ($^{14}\text{C-PTC}$)

Il est intéressant de noter que l'absorption de $^{14}\text{C-P}$ est significativement plus élevée que celle de $^{14}\text{C-C}$ bien qu'elle ne soit pas significativement différente de celle de $^{14}\text{C-PTC}$. Pourtant, la taille moléculaire des peptides dans le $^{14}\text{C-P}$ (8000 à 2500 Da) est supérieure à celle des peptides dans le $^{14}\text{C-PTC}$ (<2500 Da). Cependant, les résultats des ultra-filtrations montrent le passage de peptides issus des trois substrats ayant des poids moléculaires inférieurs à 3 000 Da.

Par autoradiographie on voit des bandes de peptides absorbés provenant du $^{14}\text{C-P}$. Ces résultats signifient que l'absorption de produits de dégradation de caséines par les enzymes digestives peuvent se faire sous forme de peptides.

Le fait que dans les autres échantillons provenant de $^{14}\text{C-C}$ et $^{14}\text{C-PTC}$ on ne voit pas de bande ni sur électrophorèse ni sur le film d'autoradiographie pourrait être une indication que dans ce cas l'absorption se fait sous forme de tri- et dipeptides ou même d'acides aminés. Mais les techniques utilisées (électrophorèse-autoradiographie) sont peut-être insuffisamment sensibles pour détecter des peptides en faible quantité. Dans l'électrophorèse, on utilise comme marqueur de front de migration le bleu de bromophénol dont la taille moléculaire est

de 670 Da. Ce poids moléculaire correspond à celui d'hexapeptides qui, s'ils existent, ne seraient pas révélés sur le gel par le bleu de Coomassie.

La présence d'un marqueur radioactif à l'activité spécifique peut former des images sur le film. Nous avons observé des bandes de ^{14}C -hydrolysats PTC sur le film d'autoradiographie alors qu'elles ne sont pas détectées sur le gel (Figure 48,49). Par contre, l'équipe de MARCON-GENTY *et al.*, (1985)⁹ dans leur étude de transport de la β -lactoglobuline à travers l'iléon de lapin *in vitro*, a pu montrer l'absorption de cette protéine sous forme intacte. Cette équipe a séparé les molécules absorbées par la membrane intestinale en utilisant le CLHP et détecté la présence de la β -lactoglobuline dans les fractions de CLHP par l'ELISA. Ils ont suggéré que le transport de cette substance était vraisemblablement transcellulaire. Ceci a également été observé par d'autres auteurs (KILSHAW et SLADE, 1980; DUCROC *et al.*, 1983; HEYMANN *et al.*, 1986).

On constate que dans nos conditions expérimentales pour la majorité des échantillons déposés sur le gel d'électrophorèse, la radioactivité (10000 cpm) n'est pas suffisante pour mettre en évidence tous les fragments peptidiques qui migrent séparément sur le gel. De même, nous n'avons pas pu détecter l'absorption de caséines intactes.

3.6.5.3. Effet des caséines sur la perméabilité de la muqueuse intestinale

Le test d'absorption de ^{14}C -PEG-4000 en présence de caséines entières montre que celles-ci n'exercent aucun effet sur la perméabilité de la muqueuse. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés récemment par MALO et MORIN (1986) et BERANT *et al.*, (1988). La première équipe a étudié la modification de la muqueuse intestinale de souris induite par l' α -lactalbumine et l'ovalbumine en utilisant la technique de culture d'organe. Ils ont constaté qu'après 24 H d'incubation des tissus en présence de l' α -lactalbumine ou de l'ovalbumine, l'état physiologique de la muqueuse reste le même que celui des témoins. La deuxième équipe a évalué la pénétration de la peroxydase de Raifort (HRP) dans le jéjunum de porc perfusé par le lait de vache. Leurs résultats montrent que le marqueur ne traverse pas la paroi jéjunale sauf chez l'animal préalablement sensibilisé par la β -lactoglobuline. Chez l'animal non sensibilisé, les protéines du lait n'exercent pas d'effet sur la perméabilité. On peut donc penser que l'absorption de peptides de poids moléculaires égaux ou inférieurs à 3000 Da provenant des caséines ou de leurs hydrolysats s'effectue par un passage par la membrane intestinale normale sans irritation par les caséines elles-mêmes.

Cependant, il est rapporté que la réexposition de la membrane mucosale au même allergène peut rendre la muqueuse plus perméable aux macromolécules "by stander" (BLOCH et WALKER, 1977; KLEIMAN *et al.*, 1981).

3.6.5.4. Mécanisme d'absorption

Les résultats du test de perméabilité de ^{14}C -PEG-4000 dans les sacs intestinaux indiquent une limite vis-à-vis de ce produit. Cependant, dans le même temps, il y a des passages de caséines et de leurs hydrolysats.

Si on compare les masses moléculaires de ces trois produits, on note que les caséines ont le plus haut PM (environ 24000) suivi par l'hydrolysats P (environ 6000 Da) et l'hydrolysats PTC (environ 2500). En fonction de leurs poids moléculaires, le PEG-4000 et le PTC devraient être absorbés plus vite. Cependant, on peut penser que la présence de peptidases au niveau des bordures en brosse continuent de dégrader les caséines et leurs hydrolysats et permet leur absorption de façon plus efficace. Il est possible que ces enzymes correspondent aux bandes de haut poids moléculaires observées sur l'électrophorèse de tous les liquides absorbés.

Récemment GUAN *et al.*, (1988) ont identifié deux nouvelles endopeptidases neutres phosphoramidon-insensible sur les bordures en brosse intestinales humaine et chez le rat. Ils ont trouvé en utilisant l'électrophorèse PAGE-SDS et la filtration sur gel que les substrats, y compris la caséine, sont rapidement dégradés par ces enzymes et absorbés par l'intestin. Les résultats de ces investigations montrent qu'en absence de protéases pancréatiques, les bordures en brosse de la membrane intestinale humaine et de rat ont la capacité de dégrader des protéines intactes et de les assimiler.

Il est possible que ces enzymes et des aminopeptidases de la bordure en brosse dégradent préférentiellement l'hydrolysats pepsique. La pinocytose pourrait également jouer un rôle dans l'absorption de ces composés. Ceci pourrait expliquer que l'hydrolysats P (6000 Da) est mieux absorbé que le PTC (2500 Da). Il en résulterait une absorption d'hydrolysats P plus élevée comme on l'a observé au cours des études d'absorption intestinale des trois produits.

Si l'on observe les peptides résultant d'hydrolyse pepsique (figures 25,26,27,28) on peut voir des peptides qui contiennent des résidus d'acides aminés de :

- 14, 2, 3, 12, 21, 3, 40, 14, 7, 21, 2, 2, 28, 4, 22, 2 et 10, pour l' α_1 -caséine
- 3, 2, 31, 92, 4, 3, 3, 1, 2, 6, 14 et 3, pour la κ -caséine.

Les chaînes peptidiques issues d'hydrolysats PTC sont plus courtes. Elles contiennent des lysines bloqués par le groupement -CHO, comme la conséquence du marquage de la caséine en ^{14}C -HCHO. De plus, d'après l'analyse par CLHP (figure 54 et 55, § 3.7) cet hydrolysats contient des peptides qui sont moins hydrophobes que ceux d'hydrolysats pepsique. Ces faits pourraient contribuer à l'absorption intestinale moins efficace de peptides issus d'hydrolysats PTC. Toutefois, ces constatations nécessitent une confirmation.

3.6.5.5. Absorption mucosale des caséines et de leurs hydrolysats P et PTC

Dans nos travaux, nous avons observé la rétention des molécules issues des caséines, d'hydrolysats P et PTC dans le tissu intestinal. STERN *et al.*, (1984) et METLER *et al.*, (1988) ont étudié la capacité de liaison des protéines du lait aux membranes de microvillosités (MVM) chez des rats nouveaux-nés et adultes. Par rapport à la liaison de la concanavaline A (Con A), la liaison des protéines du lait est faible, non spécifique et non saturable.

Les microvillosités de nouveaux-nés fixent les protéines du lait plus que celles des adultes. Ceci étant vrai pour toutes les protéines testées. La capacité de liaison augmente inversement aux poids moléculaires. Ce travail montre l'importance de la composition de la membrane en protéines et lipides, tout changement modifiant les capacités de liaison.

Les capacités de liaison de la sérum albumine bovine (SAB) et de la β -lactoglobuline aux MVM des rats nouveaux-nés ont également été étudiées (STERN *et al.*, 1984; METLER *et al.*, 1988). Ils ont eux aussi utilisé la méthode de sacs intestinaux retournés. Ce type d'investigation est fondé sur le fait que les protéines du lait de vache peuvent induire des manifestations gastrointestinales liées à l'allergie induites par ces protéines (WALKER-SMITH, 1982; SAVILAHTI et VERKASALO, 1984; VAN SICKLE *et al.*, 1985).

La liaison des protéines du lait aux MVM est une étape initiale pour le développement de la réponse de tolérance, une perturbation à ce niveau peut entraîner la réaction allergique (WALKER, 1988; REVILLARD *et al.*, 1988). Ceci a été mis en évidence pour la Con A (TAINIO et SAVILAHTI, 1987) et les protéines de soja (SJOLANDER *et al.*, 1984).

La rétention de molécules issues des caséines et de ses hydrolysats observée dans les tissus intestinaux peut être une étape qui facilite le passage de ces molécules. Il serait donc intéressant de connaître le site où s'accumule ces substances dans le tissu et la nature de la liaison, c'est-à-dire sous quelle forme elles sont captées. Sont-elles hydrolysées avant l'absorption ou captées intactes et hydrolysées *in situ*. Cette approche peut éclairer ultérieurement le mécanisme de l'absorption intestinale des antigènes et des allergènes alimentaires.

3.7. RECHERCHE DES FRAGMENTS ANTIGENIQUES ISSUS DES CASEINES

Les résultats précédents montrent l'activité lymphoblastique des caséines et de leurs hydrolysats P et PTC ainsi que la mise en évidence de l'absorption intestinale des fragments peptidiques issus des caséines. Ceci nous a conduit à rechercher les fragments peptidiques qui ont une capacité antigénique. Par la suite, nous comparons l'antigénicité des fragments filtrés par l'intestin et celle des fractions séparées par CLHP en utilisant les méthodes immunoenzymatiques.

3.7.1. CLHP-phase inverse des caséines et de leurs hydrolysats

Les hydrolysats de caséine sont séparés par CLHP phase inverse pour essayer de déterminer l'antigénicité des peptides avant leur absorption intestinale.

3.7.1.1. Séparation des caséines

Avec le type de gradient utilisé la caséine est éluée à une concentration en acétonitrile supérieure à 40 % (figure 53), alors que les peptides sont désorbés avant (figure 54). Les pics des caséines n'interfèrent donc pas avec les pics des peptides.

3.7.1.2. Séparation d'hydrolysat pepsique

Les pics majeurs sont élués à environ 30 % d'acétonitrile (figure 54). Ils correspondent donc à des peptides hydrophobes car ces derniers interagissent fortement avec la phase stationnaire. Comme le montre le tableau 32, le profil obtenu à 280 nm révèle 7 pics qui contiennent les acides aminés aromatiques tyrosine, phénylalanine et/ou tryptophane. Le pic majeur est élué à Rt 56 minutes, il constitue 8,4 % des peptides totaux.

3.7.1.3. Séparation d'hydrolysat PTC

Les peptides de cet hydrolysat commencent à être élués à partir de 10 % d'acétonitrile environ. On observe la diminution des pics des peptides majeurs hydrophobes qui sont hydrolysés par la trypsine et la chymotrypsine notamment celui du peptide de Rt 56 minutes (figure 55).

Par ailleurs, les deux profils ont quatre pics identiques de Rt 40, 43, 42 et 66 minutes (tableau 32). Ils correspondent à des peptides issus de la caséine après hydrolyse pepsique et seraient résistants à la trypsine et chymotrypsine. De plus, ces pics des deux hydrolysats absorbent à 280 nm. On observe aussi un pic de Rt 53 min sur le profil de l'hydrolysat

PTC à 215 nm et à 280 nm, il est absent sur le chromatogramme de l'hydrolysât P.

3.7.1.4. Choix des fractions CLHP des peptides pour la détermination de leur antigénicité

Le choix des fractions est fondé sur l'absorbance des peptides à 280 nm longueur d'onde d'absorption des acides aminés aromatiques et les pics majeurs à 215 nm. Pour l'hydrolysât P, nous avons donc collecté des fractions de Rt 30 à 39 min (P I) ; 40 à 41,5 min (P II) ; 42 à 54 min (P III) ; 55 à 57 min (P IV) ; 57 à 70 min (P V) (fig 54). Pour l'hydrolysât PTC, nous nous sommes intéressés aux deux pics majeurs (figure 55) (Pics de 40,44 et 53,38 min). Les fractions suivantes ont été prélevées : de 40 à 41 min (PTC I*) ; de 42 à 52 min (PTC II) ; de 53 à 53,5 min (PTC III*).

L'acétonitrile de ces fractions est éliminé par distillation sous vide à 40 °C et ensuite, les échantillons sont lyophilisés et conservés à - 20 °C.

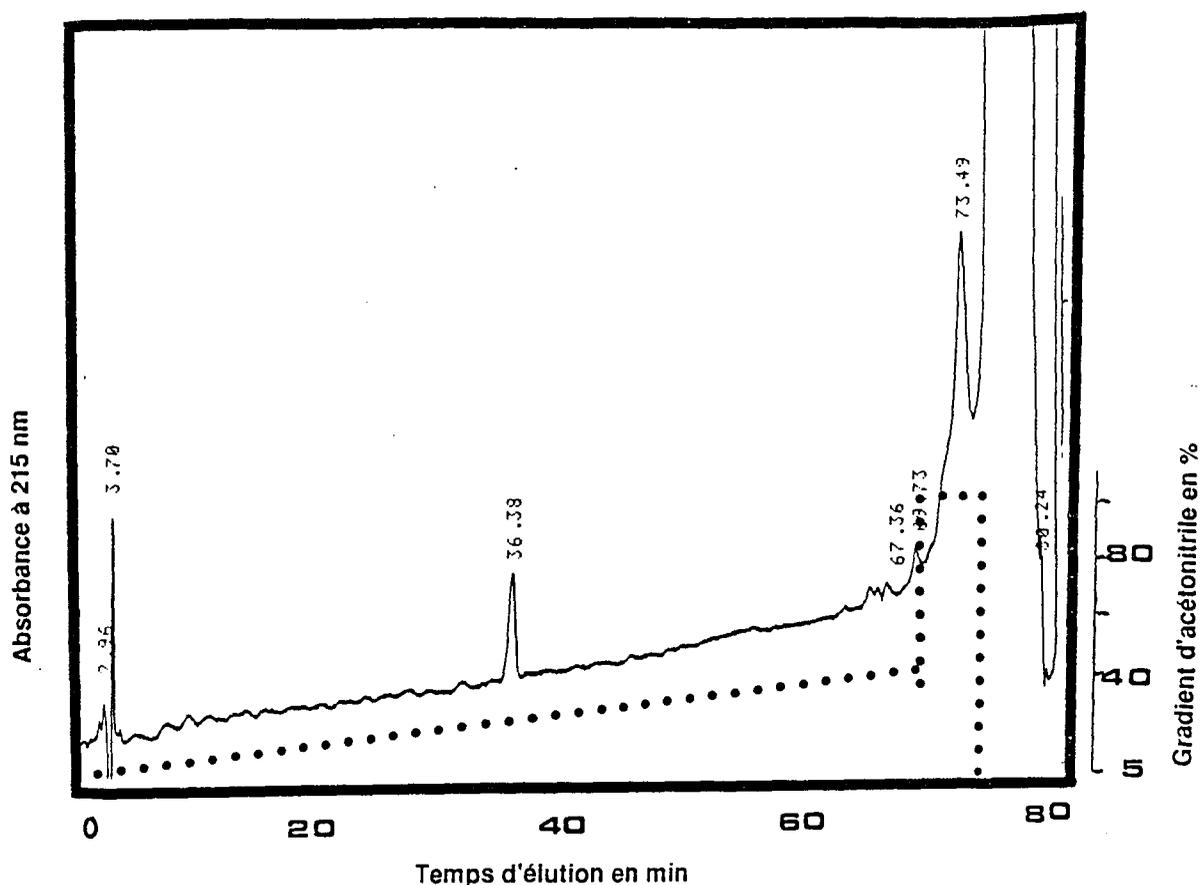


Figure 53. Profil en CLHP-phase inverse des caséines en gradient d'acétonitrile de 5 à 40 % à une absorbance de 215 nm.

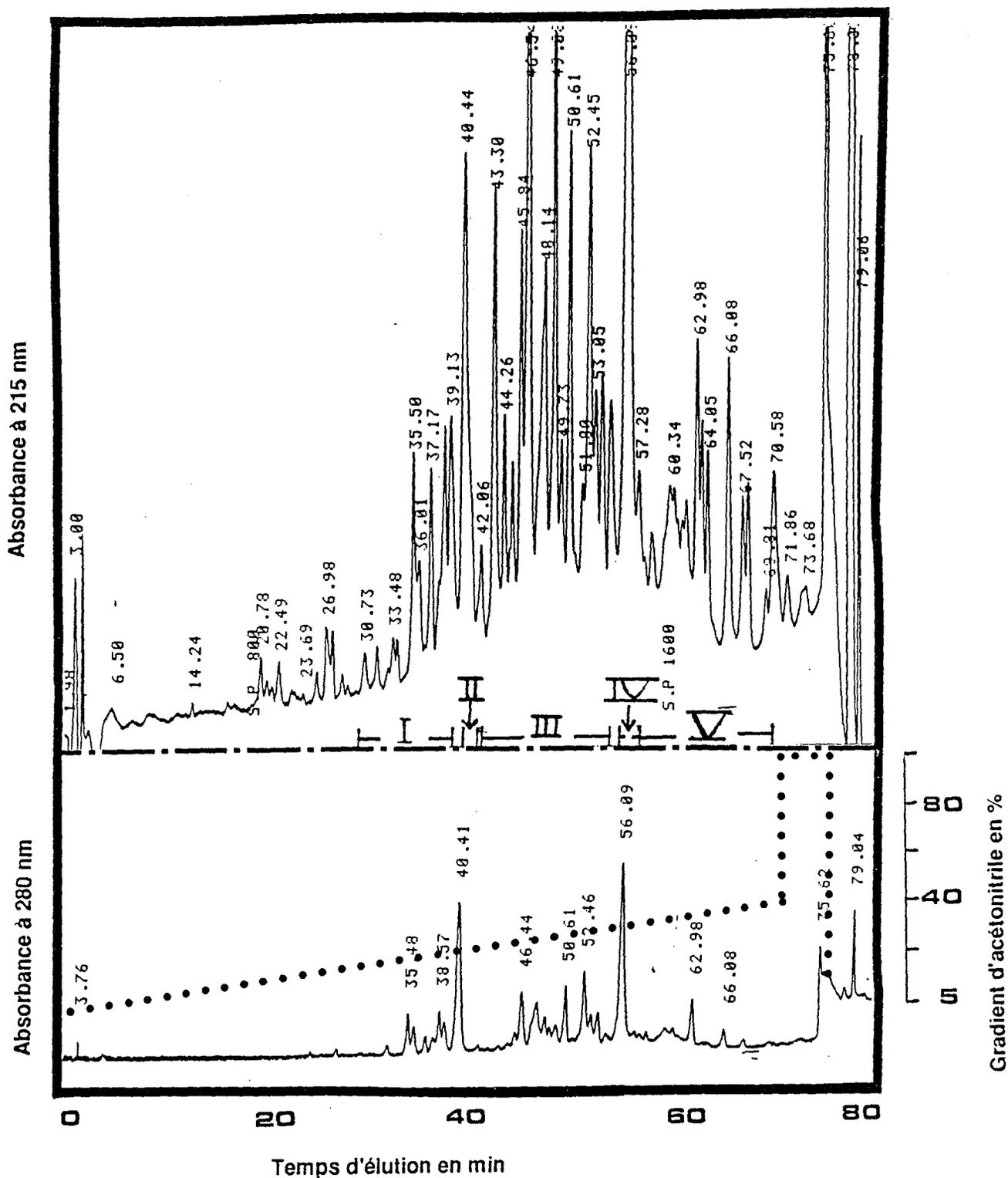


Figure 54. Profil en CLHP-phase inverse d'hydrolysat pepsique en gradient d'acétonitrile de 5 à 40 % à des absorbances de 215 et 280 nm.

I, II, III, IV, V : Fractions collectées

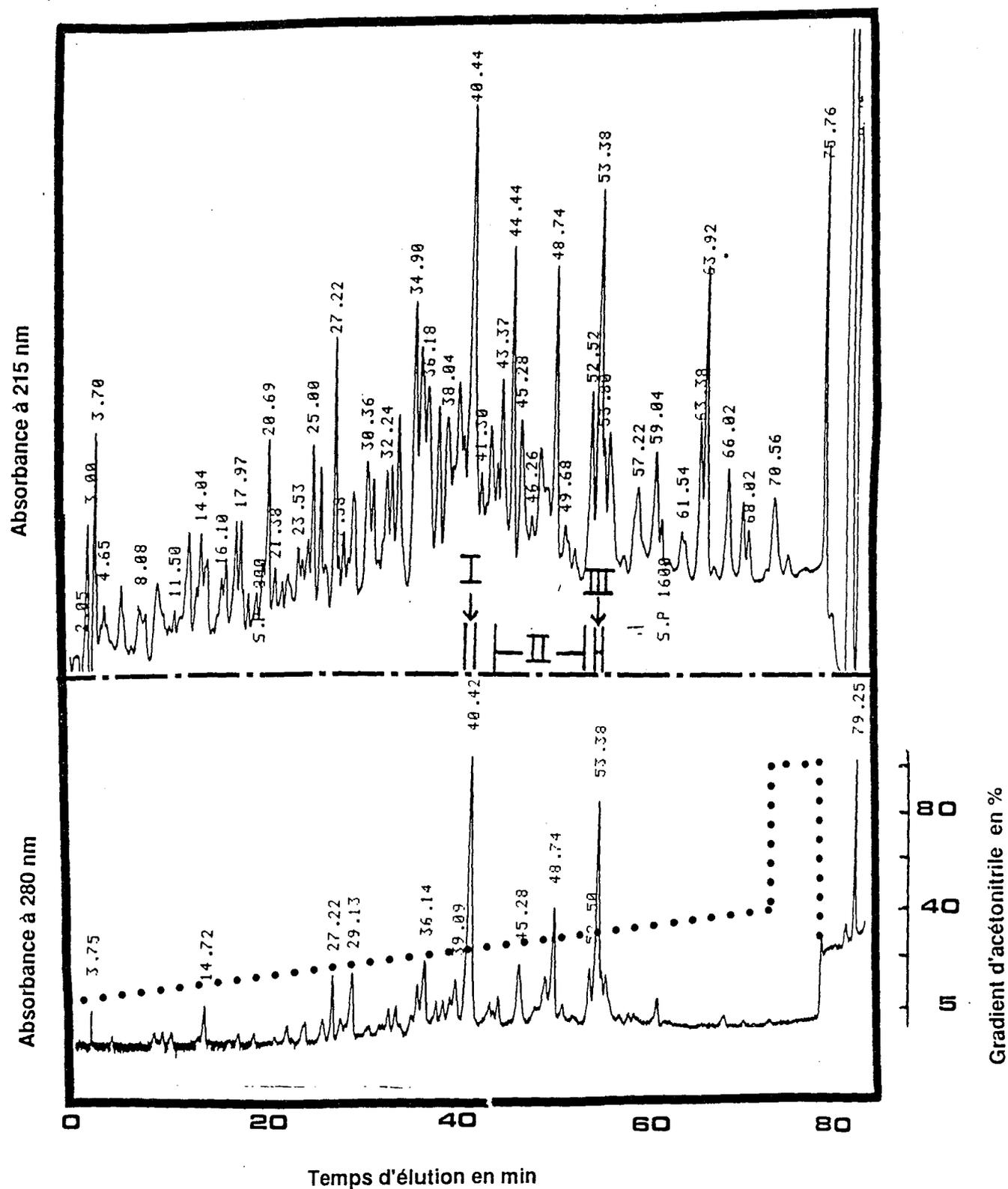


Figure 55. Profil en CLHP-phase inverse d'hydrolysate pepsique-trypsique-chymotrypsique en gradient d'acétonitrile de 5 à 40 % à des absorbances de 215 et 280 nm.

I, II, III, : Fractions collectées

TABLEAU 32. RT ET CONCENTRATION (%) DES PICS MAJEURS DES HYDROLYSATS P ET PTC

	RT	215nm	280nm	Pourcentage à 215 nm
P	35,50	+	+	1,0
	40,44*	+	+	4,0
	43,30*	+	-	2,2
	49,08	+	-	3,0
	50,61	+	+	2,2
	52,45*	+	+	2,4
	62,98	+	+	1,3
	66,08*	+	+	1,4
PTC	34,90	+	-	2,0
	36,18	+	+	1,5
	40,44	+	+	3,4
	43,37*	+	-	1,1
	48,74	+	+	2,2
	52,52*	+	+	1,
	53,58	+	+	3,6
	66,02*	+	-	1

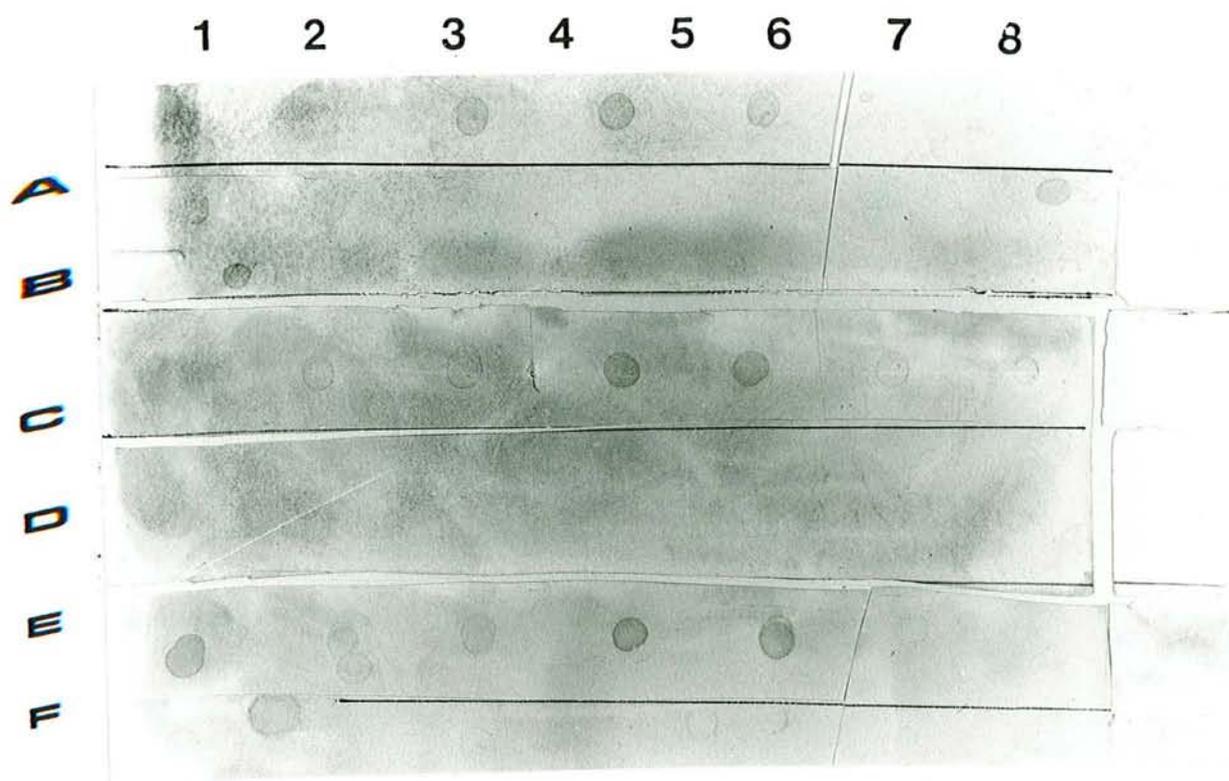
* : Pics qui ont les mêmes RT dans les deux hydrolysats

3.7.2 Antigénicité des fractions de CLHP phase inverse des hydrolysats P et PTC

Après l'étape de séparation par CLHP-phase inverse, la capacité antigénique des fractions collectées est mesurée. Les fractions testées sont les pics P II, P IV et P V, issus de l'hydrolysat P et les pics PTC I et PTC III provenant de l'hydrolysat PTC.

3.7.2.1. Antigénicité des peptides dans les fractions d'hydrolysat P et PTC déterminée par méthode immunodotting

Comme le montre la figure 56, les caséines et leurs hydrolysats P et PTC donnent des réactions antigène-anticorps positives avec les immunosérums anticaséines α , β , ainsi que κ . Ceci signifie que l'hydrolyse des caséines par l'enzyme digestive *in vitro* n'élimine pas leur antigénicité. Cependant, les fractions d'hydrolysats ne se révèlent pas toutes positives. Seules les fractions PII et PIV issues des caséines α et β montrent des réactions positives ce qui prouvent l'existence des peptides antigéniques dans ces fractions. Les fractions dérivées d'hydrolysat PTC ne se révèlent pas positives d'après ces tests. Ceci pourrait être dû au fort bruit de fond trouvé dans cette manipulation, car nous utilisons des anticorps polyclonaux. STOTT (1989) a déjà observé que l'utilisation d'anticorps polyclonaux crée souvent un bruit de fond important.



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	C, α^+	C, α^+	P, α^+	P, α^+	PTC, α^+	P II, α^+	P II, α^+	P IV, α^+
B	P IV, α^+	PV, α^+	PV, α^+	PTC I, α	PTC I, α	PTC III, α	PTC III, α	C, β^+
C	C, β^+	P, β^+	P, β^+	PTC, β^+	PTC, β^+	P II, β^+	P II, β^+	P IV, β^+
D	P IV, β^+	PV, β^+	PV, β^+	PV, β^+	PV, β^+	PTC III, β	PTC III, β	C, κ^+
E	C, κ^+	P, κ^+	P, κ^+	PTC, κ^+	PTC, κ^+	P II, κ^+	P II, κ^+	P IV, κ^+
F	P IV, κ^+	P IV, κ	P IV, κ	PTC I, κ^+	PTC I, κ^+	PTC III, κ^+	PTC III, κ^+	

Figure 56. Immunodotting des caséines (C), de leurs hydrolysats P et PTC, des fractions CLHP d'hydrolysat P(PII,IV,V) et d'hydrolysat PTC (PTC I,III).

a : Révélation du complexe antigène-anticorps sur la membrane de nitrocellulose

b : Description de la nature des "dots" des complexes antigène-anticorps. Après fixation des substances sur la membrane, elles ont été incubées avec les immunosérums : α : anti α_s caséine, β : anti β caséine, κ : anti κ caséine

+ : Révélation positive

3.7.2.2. Test ELISA

Ces manipulations sont effectuées en utilisant comme deuxième anticorps l'anti IgG conjugué à la phosphatase alcaline et la substance chromogreen comme substrat (voir matériel et méthodes §-2.4.5.). Après addition du substrat, nous avons remarqué non seulement le développement d'une coloration mais aussi l'apparition de précipités foncés au fond de tous les puits. Nous avons donc noté les colorations visuellement, la présentation de résultats d'ELISA par l'observation visuelle sont publiées par d'autres auteurs (NYGREN et STENBERG, 1989).

Comme le décrit la figure 57 et le tableau 33, les hydrolyses par la pepsine ou par les mélanges pepsine-trypsine-chymotrypsine n'éliminent pas complètement l'activité antigénique des caséines.

La dégradation par l'ensemble des trois enzymes digestives a complètement éliminé l'antigénicité de la caséine β , mais pas toute l'activité des caséines α et κ . Les fractions PTC II et PTC I provenant respectivement de ces deux dernières donnent encore des résultats positifs ce qui signifie l'existence des peptides antigéniques dans ces fractions.

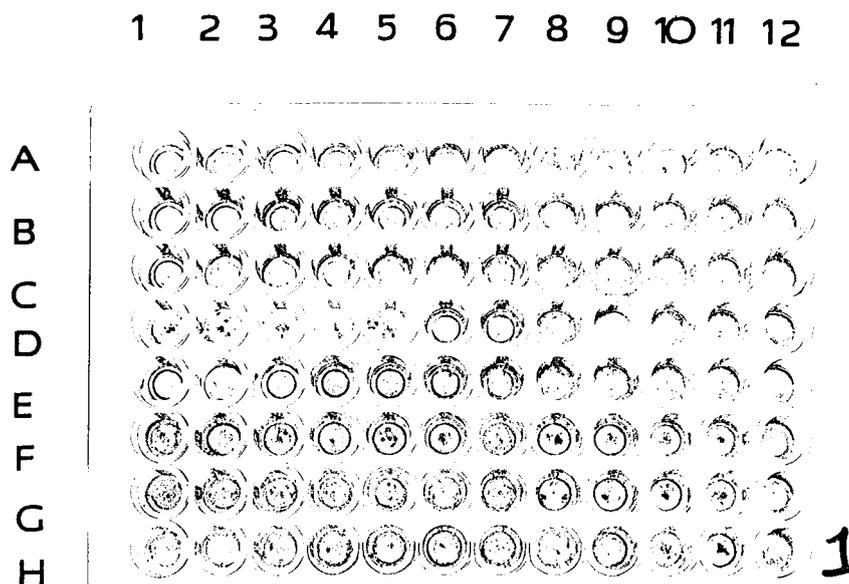
On peut noter aussi que dans cette manipulation, il y a plus de fractions qui se révèlent positives que dans la technique immunodotting. Par exemple, toutes les fractions d'hydrolysats P ainsi que celles de l'hydrolysats PTC sont positives alors qu'avec l'immunodotting on observe que seulement deux des fractions d'hydrolysats sont positives alors qu'aucune ne l'est dans l'hydrolysats PTC.

La séparation des peptides par CLHP-phase inverse est fondée sur l'hydrophobicité des molécules. Le fait que les résultats montrent l'antigénicité de presque toutes les fractions laisse donc supposer que l'hydrophobicité des peptides pourrait être une des caractéristiques qui détermine leur antigénicité.

3.7.3. Antigénicité des peptides filtrés par la membrane intestinale

Les membranes intestinales fonctionnent comme un filtre et laissent passer des molécules qui pourraient être antigéniques. Elles servent de filtres biologiques naturels ce qui facilite la recherche des épitopes des antigènes alimentaires.

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C, α					C, β					C, κ	
B	P, α					P, β						
C	P, κ					PTC, α						
D	PTC, β					PTC, κ					PII, α	
E	PII, β					PII, κ						
F	PIII, α					PIII, β					PIII, κ	
G	PIV, α					PIV, β						
H	PIV, κ					PV, α						

Figure 57 A . Révélation des complexes antigène-anticorps fixés sur les plaques ELISA en utilisant une IgG de chèvre anti-lapin conjuguée à la phosphatase alcaline.

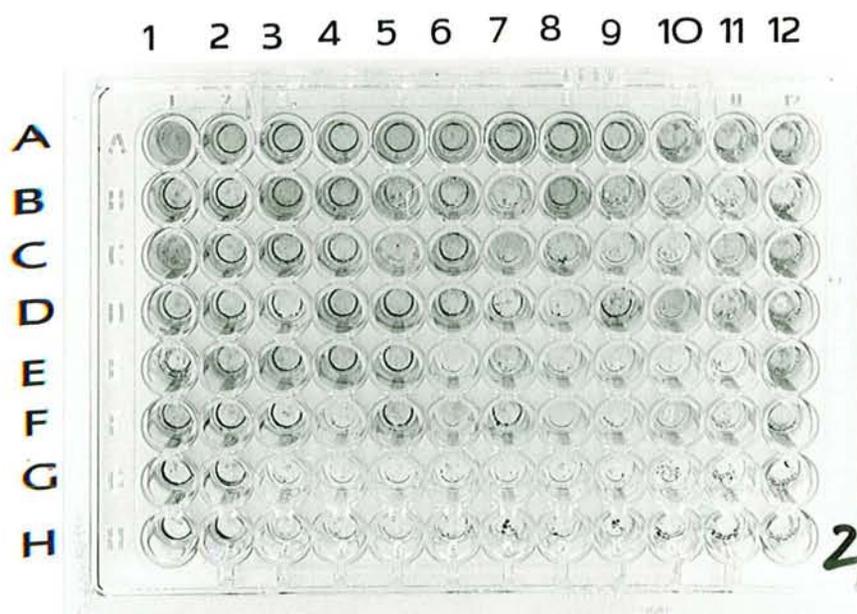
a) : révélation du complexe antigène - anticorps

b) : description de la nature des complexes révélés

Les plaques sont "cotées" avec les caséines (C), l'hydrolysate pepsique (P), l'hydrolysate PTC ou avec des fractions CLHP issues de P. Ces produits sont incubés avec des immunosérums : anti- α_1 caséine (α), anti- β caséine (β) ou anti- κ caséine (κ).

1, 2, 3, 4, 5 : dilutions des immunosérums au 1/100, 1/400, 1/800, 1/1000 respectivement.

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PV, β					PV, κ			PTC I, α			
B	PTC I, β					PTC I, κ						
C	PTC II, α			PTC II, β			PTC II, κ					
D	P III, α				P III, β							
E	P III, κ				PTC III, α							
F	PTC III, β				PTC III, κ							
G	Les blancs											
H	Les blancs											

Figure 57 B. Révélation des complexes antigène-anticorps fixés sur les plaques ELISA en utilisant une IgG de chèvre anti-lapin conjuguée à la phosphatase alcaline.

a) : révélation du complexe antigène - anticorps

b) : description de la nature des complexes révélés

Les plaques sont "cotées" avec des fractions CLHP issues d'hydrolysats P et PTC. Ces composants sont incubés avec des immunosérums : anti- α_s caséine (α), anti- β caséine (β) ou anti- κ caséine (κ).

1, 2, 3, 4, 5 : dilutions des immunosérums au 1/100, 1/400, 1/800, 1/1000 respectivement.

TABLEAU 33. RESULTATS DU TEST ELISA METTANT EN EVIDENCE UNE LIAISON PEPTIDES - ANTICORPS

Antigène	Immunsérums anticaséines		
	α	β	κ
C	+	+	+
P	+	+	+
PTC	+	+	+
PII	+	+	+
PIII	+	+	+
PIV	+	+	+
PV	+	+	-
PTCI	-	-	+
PTCII	+	-	-
PTCIII	-	-	-

C : Caséine ; P : Hydrolysat pepsique ; PTC : Hydrolysat pepsique-trypsique-chymotrypsique. II, III, IV, V : Fractions de CLHP

Les ^{14}C -caséines, ^{14}C -hydrolysat P et ^{14}C -hydrolysat PTC sont ajoutés au milieu d'incubation des sacs intestinaux et sont laissés en contact avec l'intestin pendant 30 min.

Les résultats des ultrafiltrations des liquides absorbés par l'intestin démontrent l'absorption des molécules issues de la ^{14}C -caséine, du ^{14}C -hydrolysat P et du ^{14}C -hydrolysat PTC sous forme de peptides dont les poids moléculaires sont inférieurs à 3000 Da (voir § 3.5.2.). Nous avons donc testé l'antigénicité des fragments obtenus dans ces ultrafiltrats par la méthode de "radioimmunodotting" en utilisant des immunsérums polyclonaux anti-caséines développés chez des lapins. Dans cette technique, les fragments peptidiques réagissent avec les anticorps qui sont fixés sur la membrane de nitrocellulose. Cette méthode utilise la radioactivité des fragments peptidiques pour marquer le complexe antigène-anticorps.

3.7.3.1. Mise au point de la détection de complexe ^{14}C -caséine-immunsérums anti caséines

Les immunsérums anticaséines α , β et κ sont disposés sur une feuille de nitrocellulose sur laquelle on a tracé manuellement une grille. Plusieurs dilutions d'immunsérums sont testées.

Avec ces immunsérums, on fait réagir une solution de ^{14}C -caséine 1% (activité spécifique 56 000 cpm/mg). Après la réaction antigène anticorps et lavages, les carreaux sont découpés, dissous dans du solvène et la radioactivité est comptée. Après addition de solvène, on assiste au développement d'une couleur foncée et les rendements de comptage sont faibles. Ainsi, pour la suite des expériences, les carreaux de nitrocellulose sont solubilisés directement dans le liquide scintillant (tableau 34).

TABLEAU 34. COMPLEXES ANTIGÈNE (^{14}C -CASEINE) - ANTICORPS (IMMUNSERUM ANTI-CASEINE) DÉTERMINÉ PAR MÉTHODE RADIOIMMUNODOTTING. LES RÉSULTATS SONT DONNÉS EN CPM.

14C-Caséine	IMMUNSERUMS-ANTICASEINES		
	α	β	κ
1. traité par le solvène	186	187	106
Témoin	17	19	22
2. Sans solvène	747	850	592
Témoin	14	30	18

Les rendements de radioactivité calculés à partir de complexes antigène-anticorps fixés sur le nitrocellulose sont respectivement de 13,15 et 10 % pour l'immunsérum α , β et κ caséine. Cette première expérience avait pour but de tester la technique.

3.7.3.2. Détermination des complexes antigène-anticorps formés entre les fragments filtrés par l'intestin et des immunsérums anticaséine

Comme le décrit le tableau 35, il n'existe pas de complexes avec l'immunsérum anticaséine α pour les trois produits testés. Par contre, il existe un complexe avec l'immunsérum anticaséine β dilué au 1/1000 et les fragments issus de la ^{14}C -caséine. L'immunsérum anticaséine κ dilué au 1/200 forme des complexes avec des fragments issus des ^{14}C -hydrolysats P et ^{14}C -hydrolysats PTC se forment pour des dilutions au 1/200. Il faut souligner que la dilution de 1/250 est recommandée par EL BARI (1989) qui a préparé ces immunsérums. Ces résultats suggèrent l'existence de fragments antigéniques issus de la filtration intestinale des ^{14}C -caséine, ^{14}C -hydrolysats P et ^{14}C -PTC. Ces fragments sont issus plus particulièrement des caséines et des hydrolysats P et PTC provenant de caséine κ . Ces peptides ont des poids moléculaires inférieurs à 3000 Da (voir 7.4.2)

3.7.3.3. Antigénicité des peptides déterminée par la méthode d'immunodotting.

Les peptides issus des ^{14}C -caséines, de ^{14}C -hydrolysats P et ^{14}C -hydrolysats PTC filtrés par la membrane intestinale sont analysés ultérieurement par la méthode d'immunodotting. Les antigènes, fixés sur la membrane de nitrocellulose, ont été mis en présence avec des anticorps

anticaséine α , β et κ (dilution 1/200). La révélation est réalisée par une IgG conjuguée à la phosphatase alcaline (matériel et méthodes § 2.4.5).

TABLEAU 35. COMPLEXES ANTIGENE-ANTICORPS FORMES ENTRE DES FRAGMENTS MARQUÉS, FILTRÉS PAR L'INTESTIN ET DES IMMUNSERUMS ANTICASEINES DETERMINES PAR LA METHODE RADIOIMMUNODOTTING. LES RESULTAS SONT EXPRIMES EN CPM.

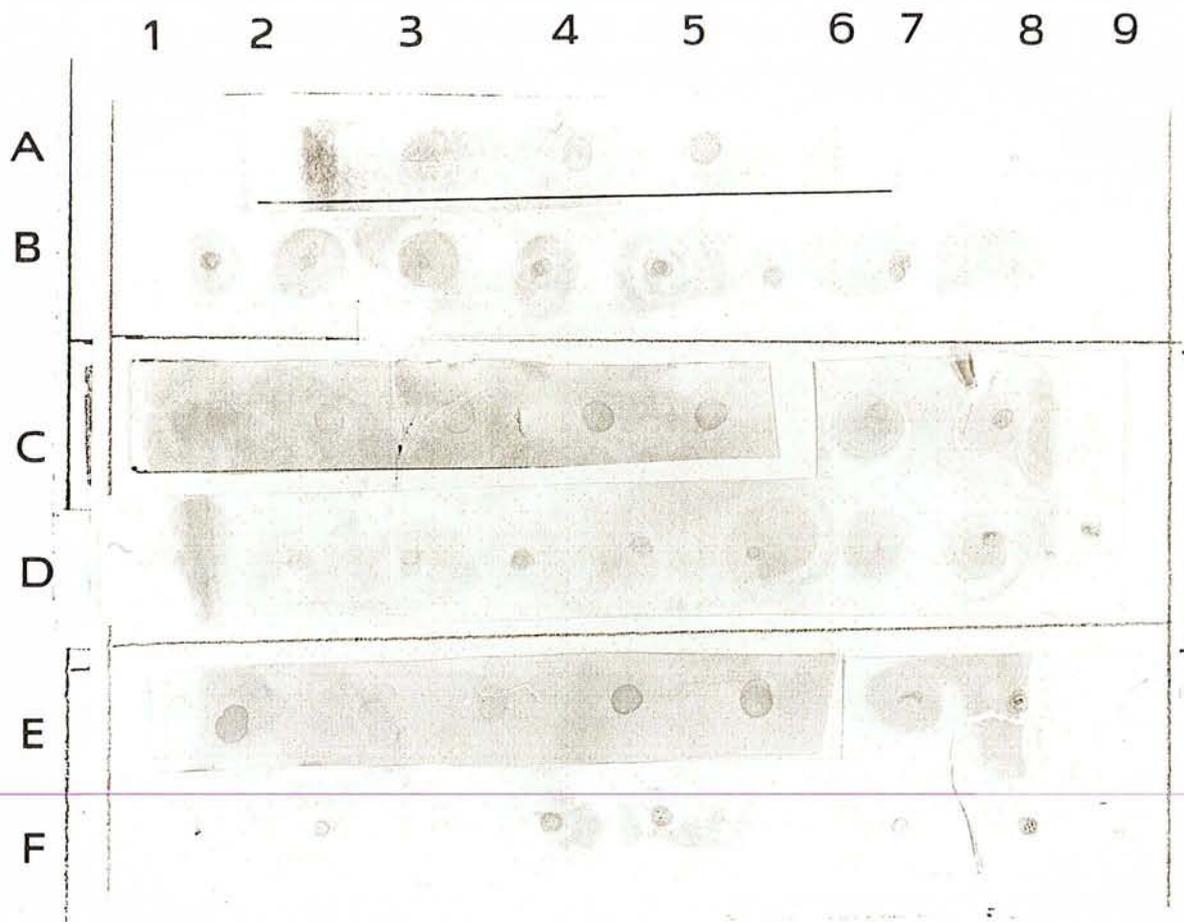
Sources des produits absorbés par l'intestin	SERUM ANTICASEINES		
	α	β	κ
14C Caséine 1	20	30	28
2	28	24	47
3	24	67	30
4	23	17	21
5	45	181*	16
14C Hydrolysat			
P 1	69	27	20
2	23	22	75*
3	27	31	26
4	16	65	35
5	28	16	18
14C Hydrolysat			
PTC 1	30	25	15
2	32	28	320*
3	51	25	29
4	29	22	29
5	31	27	23
TEMOIN	21	23	30

1,2,3,4,5 : Dilution d'antisérum de 1/100,1/200,1/400,1/800,1/1000

* : Présence de complexe antigène-anticorps

Comme le montre la figure 58, tous les échantillons filtrés par l'intestin et testé, ainsi que la caséine et ses hydrolysats (figure 56) se révèlent positifs. On constate donc que cette méthode est plus sensible que la méthode de radioimmunodotting. Ceci pourrait être dû à la

a)



b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
A		C	C	P	P	PTC		CJ		α
B	CJ	PJ	PJ	PTC J	PTC J	CI	CPI	PTC I		
C	C	C	P	P	PTC		CJ	CJ	PJ	β
D	PJ	PTC J	PTC J	CI	CI	PI	PI	PTC J	PTC J	
E	C	C	P	P	PTC		CJ	CJ	PI	κ
F	PJ	PTC J	PTC J	CI	CI	PI	PI	PTC I	PTC I	

Figure 58. Immunodotting des caséines (C), de leurs hydrolysats pepsique (P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC), et des peptides dérivés après leur absorption intestinale.

a) : Révélation du complexe antigène - anticorps

b) : Description de la nature des complexes révélés

C : Caséines entières P : Hydrolysats pepsique

PTC : Hydrolysats pepsique-trypsique-chymotrypsique

J : Absorbé par le jéjunum I : Absorbé par l'iléon

Ces produits sont incubés avec des immunosérums : anti- α_s caséine (α), anti- β caséine (β) ou anti- κ caséine (κ).

activité des peptides absorbés par l'intestin qui est très faible (400 cpm/ μ l) ce qui fait que la radioactivité des complexes antigène-anticorps n'est pas décelable. De plus, ces résultats prouvent que malgré l'hydrolyse d'enzymes digestifs et le procédé d'absorption intestinale qu'ont subi les caséines, il demeure des peptides qui sont antigéniques.

3.7.4. Discussion

3.7.4.1 Comparaison des résultats obtenus avec les méthodes d'immunodotting et d'ELISA

Nous avons observé par la méthode immunoenzymatique que les peptides qui résultent de l'hydrolyse d'enzymes digestives *in vitro*, gardent toujours leur antigénicité. Cette activité est encore préservée après leur absorption intestinale.

Les résultats sur l'antigénicité des caséines, hydrolysats P et PTC sont identiques avec la méthode d'immunodotting et d'ELISA. Pour les tests d'antigénicité des fractions de CLHP des hydrolysats P et PTC, il existe une différence : la méthode ELISA est vraisemblablement plus sensible. Ceci pourrait être dû à la différence de concentration d'antigène utilisé. Dans la méthode d'immunodotting nous n'avons utilisé que 5 μ l de chacune des fractions, alors que dans l'ELISA nous avons utilisé 50 μ l. Il est suggéré par NYGREN et STENBERG, 1989 que la fixation initiale d'anticorps à un antigène immobilisé est proportionnelle aux concentrations superficielles d'antigène (S_r), à la concentration initiale d'anticorps dans l'échantillon (C_o) et à la constante de la vitesse de fixation (K_f) :

$$d \text{ Sab}/dt = K_f C_o S_r$$

où Sab est la concentration superficielle d'anticorps fixé.

Il est donc possible que la quantité plus élevée de peptides fixés dans la méthode d'ELISA rende la technique plus sensible.

Par ailleurs, les plaques de polystyrène employées dans l'ELISA n'ont pas une porosité qui laisseraient passer des molécules de faible masse moléculaire. Tous les peptides sont théoriquement fixés au fond du puits. Dans nos expériences d'immunodotting nous avons utilisé la membrane de nitrocellulose ayant une porosité de 0,2 μ . Cependant, il est possible que les peptides de faible masse moléculaire ne soient pas tous retenus sur la membrane.

3.7.4.2 Caractéristiques chimiques des peptides antigéniques

Si l'on considère que la méthode d'immunodotting dans les conditions expérimentales utilisées est moins sensible, la positivité des fractions P II et P IV dérivées des caséines α et β déterminée par

l'immunodotting, devient donc importante à noter car elle signifie que les peptides de ces fractions ont une activité antigénique plus forte.

On peut remarquer que la fraction P II présente une absorption importante à 280 nm, elle doit donc contenir un pourcentage important d'acides aminés aromatiques tandis que la P IV est un pic majeur qui contient des peptides plus hydrophobes (figure 54). Ceci laisse supposer que les acides aminés aromatiques ou ceux qui sont les plus hydrophobes, pourraient contribuer à l'antigénicité des caséines.

ASS (1988) a rapporté que le déterminant antigénique d'une protéine comprend normalement 6 à 7 résidus d'acides aminés contenant lysine, acide aspartique et acide glutamique (voir figure 6). D'après nos résultats, qui sont en accord avec ceux de OTANI et HOSONO (1987), les déterminants antigéniques des peptides sont moins liés au résidus lysyl, arginyl, aspartyl et glutamyl, car ces liaisons peptidiques sont théoriquement complètement coupées par les trois enzymes digestifs utilisés. Cependant, en plus de ces acides aminés, l'hydrophobicité des peptides et des acides aminés aromatiques exerce également l'effet sur l'antigénicité des protéines.

L'isolement et le séquençage des peptides absorbés par l'intestin ayant une activité antigénique seraient nécessaires à réaliser afin de pouvoir les comparer avec des peptides antigéniques des hydrolysats de caséines avant l'absorption intestinale. En fait, des épitopes des caséines ont été rapportés par plusieurs auteurs (OTANI *et al.*, 1986; OTANI et HOSONO, 1987). Mais ces sites antigéniques ont été déterminés par des méthodes immunochimiques. Il serait donc intéressant de savoir si les épitopes déterminés avant l'absorption intestinale correspondent à ceux après l'absorption.

3.7.4.3 L'antigénicité des peptides de faible poids moléculaire

Dans la recherche des épitopes des antigènes alimentaires, l'étape de dégradation des molécules est indispensable pour pouvoir les exposer le mieux possible à toutes les réactions chimiques postérieures. L'équipe d'OTANI (OTANI *et al.*, 1985; OTANI *et al.*, 1986; OTANI et HOSONO, 1987), en utilisant la méthode d'immunoprécipitation, a repéré les sites antigéniques des caséines α et β dans la région N-terminale respectivement dans les séquences 1-139 et 1-93. Les sites antigéniques ont été révélés après hydrolyse des caséines par la pepsine ou chymosine.

Une autre série d'expériences d'OTANI *et al.*, 1985a; 1985b, est consacrée à la recherche d'épitopes de la β -lactoglobuline après dénaturation par la chaleur en présence de lactose, puis dégradation par la 2-(2-nitrophénylsulphenyl)-3-méthyl-3-bromoindolénine (BNPS-skatole) et révélation des sites antigéniques par le test d'inhibition d'ELISA.

Ces hypothèses encouragent l'utilisation des enzymes protéolytiques pour l'élimination de l'antigénicité des protéines alimentaires. PAHUD *et-*

al., (1985) ont éliminé l'antigénicité de la β -lactoglobuline et des autres protéines du lactosérum par l'hydrolyse trypsique. Ils ont prouvé que les hydrolysats de ces protéines n'ont plus de capacité allergénique pour le lapin.

Plus récemment, OTANI et HOSONO (1987) ont démontré l'antigénicité de la caséine après l'hydrolyse par la trypsine et la protéase V8, bien que les poids moléculaires des peptides obtenus soient respectivement compris entre 3600 et 240 Da, 1400 et 245 Da. EL BARI (1989) a observé que toutes les fractions protéiques de l'hydrolysats de caséine jusqu'au poids moléculaire d'environ 10000 Da ont une réactivité antigénique croisée plus ou moins importante reconnue par l'immunsérum anti-caséine β . Les résultats de nos présents travaux révèlent l'existence de peptides antigéniques dans les caséines non seulement après l'hydrolyse par les pepsine-trypsine-chymotrypsine mais aussi après leur absorption intestinale. Ces peptides ont des poids moléculaires d'environ 3000 Da et sont dérivés des caséine β et κ .

Très récemment, il a été rapporté par des auteurs que l'hydrolysats de caséines et du lactosérum commerciaux, qui sont utilisés pour remplacer les produits du lait dans des régimes pour des nourrissons ayant des symptômes d'allergie au lait, possède encore une capacité allergénique (CHANDRA *et al.*, 1989; BUSINCO *et al.*, 1989; PLEBANI *et al.*, 1990).

CONCLUSION

CONCLUSION

L'ingestion de caséines par des souris à raison de 100 mg/jour entraîne une réponse lymphoblastique *in vitro* en présence de cet antigène et une production d'IgG totale dans le plasma ainsi que dans le surnageant de culture de lymphocytes. Cette sensibilisation est mise en évidence par le test de transformation lymphoblastique (TTL) où la présence de caséines dans le milieu de culture augmente l'incorporation de ³H-Thymidine dans les lymphocytes. Les conditions expérimentales de cultures avec lesquelles nous avons travaillé semblent optimales. Ceci est démontré par la réponse lymphoblastique des cellules en présence de la PHA.

La sensibilisation des lymphocytes *in vivo* est induite par l'apport en caséines jusqu'à 8 semaines d'ingestion chez les souris "normales" (élevées chez le fournisseur). En effet, cette sensibilisation commence déjà préalablement et de façon naturelle avant que les souris ne soient soumises à un régime sans caséine, c'est à dire avant l'âge de 6 semaines. Cette hypothèse est renforcée par les résultats des expériences chez les souris "non-contaminées" (souris de première génération élevées avec un régime privé de protéines du lait). Les réponses lymphoblastiques de ces souris ne se révèlent positives qu'après 8 semaines d'apport en caséines. L'ingestion prolongée jusqu'à 12 semaines établit la sensibilisation, alors que la prolongation de l'apport en antigène jusqu'à 12 semaines élimine cette sensibilisation. Cette dernière constatation suggère une réponse immunitaire de tolérance.

Cette sensibilisation est dépendante de l'âge auquel les souris rencontrent l'antigène. L'introduction de l'antigène les sensibilise d'autant plus vite et plus fort que les souris sont plus jeunes.

Nous avons étudié la capacité proliférative (induite par les hydrolysats caséiniques obtenus avec les enzymes digestives) des lymphocytes des souris ayant ingérées les caséines. On remarque que les hydrolysats pepsique (P) et pepsique-trypsique-chymotrypsique (PTC) peuvent induire l'incorporation de ³H-Thymidine dans les lymphocytes et qu'ils ont la même capacité stimulante que la caséine entière.

L'ensemble de ces résultats prouvent que: 1) les caséines peuvent sensibiliser les lymphocytes de souris par voie digestive, 2) les lymphocytes sensibilisés reconnaissent non seulement les caséines mais aussi leurs fragments, autrement dit, l'hydrolyse des caséines par les trois enzymes digestives n'élimine pas leurs déterminants antigéniques et 3) ces trois produits portent les mêmes capacités antigéniques.

Toutefois ces constatations ne sont pas encore suffisantes pour affirmer une activité allergénique. En effet, la production d'IgG totales dans le plasma ainsi que dans les surnageants de culture de lymphocytes n'est pas parallèle à la production d'IgG spécifiques anticaséines. De plus, il n'existe pas d'indication de la production d'IgE par les souris car les résultats du test de la libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM) et du test cutané ne se révèlent pas positifs.

Cependant, la sensibilisation de lymphocytes et l'accumulation d'histamine dans les mastocytes après apport en caséines sont des éléments importants qui permettent de penser qu'un déclenchement de la réaction allergique serait possible.

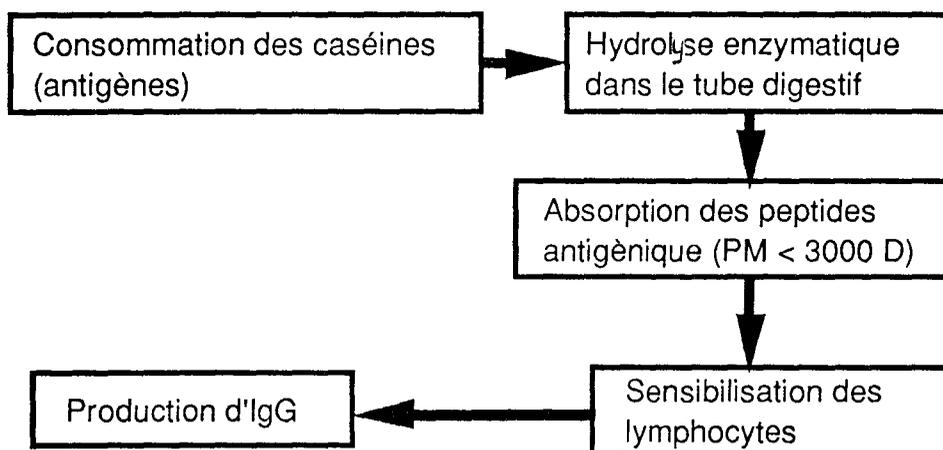
D'après les résultats tirés de ces expériences sur l'effet de l'apport en caséines au niveau des lymphocytes et mastocytes, nous avons deux alternatives pour élaborer le mécanisme de la sensibilisation par les caséines. On peut continuer l'étude au niveau des cellules ou repartir en arrière et mettre en évidence l'absorption intestinale des antigènes. Ceci est important car l'intestin représente la première porte d'entrée des antigènes alimentaires.

Les résultats des expériences d'absorption intestinale en utilisant les sacs intestinaux retournés de souris montrent des passages des antigènes issus des caséines et de leurs hydrolysats P et PTC. L'analyse ultérieure par électrophorèse et autoradiographie ne montre que l'absorption des fragments dérivés de l'hydrolysate P. Ces fragments ont des poids moléculaires d'environ 2500 Da.

Cependant l'identification par la méthode ultrafiltration montre l'absorption de fragments issus de ces trois produits de poids moléculaires inférieurs à 3000 Da. Ces fragments ainsi absorbés contiennent toujours des sites antigéniques (déterminés par les méthodes d'immunodotting et de radioimmunodotting).

La détermination de l'antigénicité des caséines natives et de leurs hydrolysats P et PTC est réalisée par des méthodes ELISA et immunodotting en utilisant les immunosérums anti caséines α , β et κ . Cette capacité est retrouvée dans toutes les fractions CLHP testées sauf pour les fractions provenant de l'hydrolysate PTC. Ces dernières ne forment pas de complexe antigène-anticorps avec les immunosérums anti caséine κ .

L'ensemble des résultats trouvés dans ces études révèle les étapes de la sensibilisation par les caséines qu'on peut résumer comme suit :



Des travaux plus élaborés au niveau des lymphocytes (antigène présentation, sous population de cellules T, médiateurs lymphokines) seraient intéressants pour mieux comprendre la nature de la réponse lymphoblastique vis-a-vis des caséines. Au niveau des mastocytes, l'étude du métabolisme de l'histamine provenant des caséines serait nécessaire dans l'étude de la dégranulation de cette cellule. La recherche plus approfondie du mécanisme d'absorption intestinale des antigènes issus des caséines pourrait mieux expliquer l'influence de l'intestin sur le passage de ces antigènes. Pour la détermination ultérieure des épitopes des caséines, il serait important d'effectuer le sequencage des acides aminés des peptides antigéniques avant et après l'absorption intestinale et d'observer leur corrélation.

BIBLIOGRAPHIE

AAS K. (1988)

The biochemistry of food allergens. What is essential for future research ?

SCHMIDT E. (ed), Food Allergy, Nestec Ltd, N.Y., 199-207.

ABOU-GHORRAH S. (1987)

Etude du Système Proteolytique de *Streptococcus thermophilus* : Purification et caractérisation d'une protéase exocellulaire de la souche CNRZ 302.

Thèse, Université de NANCY I.

ADIBI S.A. (1971)

Intestinal transport of dipeptides in man : relative importance of hydrolysis and intact absorption.

J. Clin. Invest., 50, 2266-2275.

AHLSTEDT S., BENGTSSON U., CARLSSON B., FALLSTROM S.P., WOLD A.E. and HASON L.A. (1987)

Immune responses to food proteins in healthy individuals and patients with food intolerance.

CHANDA R.K. (ed), Food Allergy, Newfoundland, 191-200.

ALAIS C. (1984)

Principes des techniques laitières.

Science du lait. Sepaic, Paris, 107-200.

ALBANI S., AVANZINI M.A., PLEBANI A., SCOTTA M.S., PERVERSI S., LICARDI G., UGAZIO A.G. and BURGIO G.R. (1989)

Diagnostic value of a lymphocytes stimulation test in cow milk protein intolerance.

Ann. Allergy, 63, 489-492.

ALM P.E. (1983)

Sodium fluoride evoked histamine release from mast cells. A study of cyclic AMP levels and effects of catecholamines.

Agents Actions, 13 (1/2), 132-134.

ANDERSSON J., MOLLER G. and SJOBERG O. (1972)

Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes.

Cell. Immunol., 4, 381-386.

ANDRE C., ANDRE F and COLIN L. (1989)

Effect of allergen ingestion. Challenge with and without cromoglycate cover on intestinal permeability in atopic dermatitis, urticaria and other symptoms of food allergy.

Allergy, 44, (suppl.), 9, 47-51.

ADRIAN J. (1987)

Les vitamines.

Le Lait Matière Première de l'Industrie Laitière. CEPIL, INRA, Paris, 113-120.

ASSELIN J., AMIOT J., GAUTHIER S.F., MOURAD W. and HERBERT J. (1988)

Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysates.

J. Food Sci., 53, 1208-1211.

ATKINSON G., ENNIS M. and PEARCE F.L. (1979)

The effect of alkaline earth cations on the release of histamine from rat peritoneal mast cells treated with compound 48/80 and peptide 401.

Br. J. Pharmacol., 65, 395-402.

BAENKLER H.W. and LUX G. (1989)

Antigen-induced histamine-release from duodenal biopsy in gastrointestinal food allergy.

Ann. Allergy, 62, 449-452.

BALDO B.A. and DONOVAN G.R. (1988)

The structural basis of allergenicity : recombinant DNA-based strategies for the study of allergens.

Allergy, 43, 81-97.

BECKER S., HADDIN V., SCHORLEMMER H.V. and BITTER-SUERMAN D. (1978)

Demonstration of high-affinity binding sites for C3a anaphylatoxin on guinea pig platelets.

Scan. J. Immunol., 8, 551-555.

BECKER E.L. (1989)

The continuing scientific odyssey of Frank Austen.

TAUBER et al (eds), Biochemistry of the Acute Allergic Reactions. Fifth Inter. Symp. Alan R. LISS Inc., N.Y., 1-20.

BEFUS A.D., PEARCE F.L., GAULDIE J., HORSEWOOD P. and BIENENSTOCK J. (1982)

Mucosal mast cells. I. Isolation and Functional characteristics of rat intestinal mast cells.

J. Immunol., 126 (6), 2475-2480.

BENACERRAF B. and Mc DEVITT H.O. (1972)

Histocompatibility linked immune response genes.

Science, 175, 273-280.

BENVENISTE J., EGIDO J., MILLET V.G., and GAMUSI G. (1977)

Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation.

J. Allergy Clin. Immunol. 59, 4, 271-279.

BENVENISTE J. (1986)

Hypersensibilité immédiate.

CHARPIN (ed), Allergologie, Flammarion-Médecine- Sciences, Paris. 73-92.

- BENYON R.C., ROBINSON C., HOLGATE S.T. and CHURCH M.K.** (1987)
Prostaglandin D2 release from human skin mast cells in response to ionophore A 23187.
Br. J. Pharmacol., 92, 635-638.
- BERANT M., GOLDBERG H. and LICHTIG C.** (1988)
Effect of cow's milk on jejunal mucosal macromolecular barrier in suckling guinea pigs.
Isl. J. Med. Sci., 24, 84-87.
- BERGMEYER H.U.** (1983)
Methods of Enzymatic Analysis II.
UCH. Publ., 265-269.
- BERNIER J.J., ADRIAN J. and VIDON N.** (1988)
Les aliments dans le tube digestif.
Doin Editeurs, Paris, 167-180.
- BIELORY L., KEMENY D.M., RICHARD D. and LESSOF M.H.** (1990)
IgG subclass antibody production in human serum sickness.
J. Allergy Clin. Immunol., 85, 573-577.
- BJORKSTEN B., AHLSTEDT S., BJORKSTEN S., CALSON B., FALLSTROM S.P., et al.** (1983)
Immunoglobulin E and immunoglobulin G4 antibodies to cow's milk in children with cow's milk allergy.
Allergy, 38, 119-124.
- BLASZCZYK-B E., WYCZOLKOWSKA J. and MASLINSKY C.** (1980)
Keyhole limpet hemocyanin (KLH) - A potent antigen in reaginic sensitization of mice and rats : a comparison with egg albumin (EA) induced reaction.
Arch. Immunol. et Ther. Exp., 28, 533-539.
- BLEUMINK E. and YOUNG E.** (1968)
Identification of the atopic allergen in cow's milk.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 34, 521-543.
- BLOCH K.H. and WALKER W A.,** (1977)
Effect of locally induced intestinal anaphylaxis on the uptake of a bystander antigen.
J. Allergy Clin. Immunol 67, 312-316.
- BOUNOUS G. and KONGSHAVN A.L.P.** (1985)
Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice.
J. Nutr., 115, 1403-1408.
- BRANTL V., TESCHMACHER H., HENSCHEN A. and LOTTSPREICH F.** (1979)
Novel opioïd peptides derived from casein (B casomorphins).
Hoppe-Zeyler's Physiol Chem, 360, 1211-1216.

BRAUNISTER G., CHEN R., SCHRANK B. and STANGL A. (1972)

Automatische sequenz analyse eines proteins (lactoglobuline AB).
Hoppe Seyler's Z. Physiol chem, 353, 832-834.

BRENEMAN J.C., SWEENEY M. and ROBERT A. (1989)

Patch test demonstrating immune (antibody and cell-mediated) reactions to foods.
Ann. Allergy. 62, 119-124.

BREW K., CASTELLINO F.J., VANAMAN T.C. and HILL R.L. (1970)

The complete amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin.
J. Biol. Chem., 245, 4570-4582.

BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J.C. and PELISSIER J.P. (1977)

Complete amino acid sequence of alpha-S2-caseine.
FEBS Letters, 76, 274-279.

BRUCE M.G. and FERGUSON A. (1986a)

The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumine in mice.
Immunology, 59, 295-300.

BRUCE M.G. and FERGUSON A. (1986b)

Oral tolerance to ovalbumine in mice : studies of chemically modified and "biologically-filtered" antigen.
Immunology, 57, 627-630.

BRULE G. and FAUQUANT J. (1982)

Intéractions des protéines du lait et des oligoéléments.
Lait, 62, 323-331.

BRULE G., ROGER L., FAUQUANT J. and PIOT M. (1982)

Phosphopeptides from casein based material.
United State Patent 4 358, 4b5, 9/1982.

BRULE G. (1987)

Les minéraux.

CEPIL, Le lait, Matière Première de l'Industrie Laitière. INRA, Paris, 87-

BUDDINGTON R.K. and DIAMON J.M. (1989)

Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters.
Ann. Rev. Physiol., 51, 601-619.

BURGER M., HESS M.W. and COTTIER H. (1983)

The mechanism of Si SO₂ (Aerosil)-mediated enhancement of the proliferative response of mouse spleen lymphocytes to antigen and mitogens in a serum-free system.
Eur. J. Immunol., 13, 331-335.

- BUSINCO L., CANTANI A., LONGHI A. and GIAMPIETRO P.G.** (1989)
Anaphylactic reactions to a cow's milk whey protein hydrolysate (Alpha-Ré, Nestlé) in infants with cow's milk allergy.
Ann. Allergy, 62, 333-335.
- CAMPBELL D.E., NGAM PHAI BOON J., CLARK M.M., HARRIS M.C., KOLSKI G.B. and DOUGLAS S.D.** (1987)
Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulins E and G to purified cow's milk proteins : application in diagnosis of cow's milk allergy.
J.Clin. Microbiol., 25 ,2114-2119.
- CANDUSSIO L., KLUGMANN F.B., DECORTI G., BEVILACQUA S. and BALDINI L.** (1987)
Dimethyl sulfoxide inhibits histamine release induced by various chemicals.
Agents Actions, 20, 17-21.
- CANT J.A.**, (1988)
The Symptomatology of food allergy.
SCHMIDT, E., (ed), Food Allergy, NNWS, vol. 17, Nestec, N.Y. 127-134.
- CAPRON A. and DESSAINT J.P.** (1990)
From protective Immunity to allergy. The cellular partners of IgE.
WAKSMAN (Ed), 1938-1989. Fifty years Progress in Allergy. Chem. Immunol., Basel, 49, 236-244.
- CARLIER H., BERNARD A. and HUGON J.S.** (1989)
Cell and organ culture.
Prog. Pharmacol. Clin. Pharmacol., 7, 56-68.
- CARTER E.A., BLOCH K.J., COHEN S., ISSELBACHER K.J. and WALKER W.A.** (1981)
Use of hydrogen gas (H₂) analysis to asses intestinal absorption.
Gastroenterology, 81,1091-1097.
- CAVAILLON J.M. et DAVID B.** (1987)
Transformation lymphoblastique induite par les allergènes.
Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin., 4, 193-198.
- CHANDRA R.K., SINGH G. and SHRIDHARA B.** (1989)
Effect of feeding whey hydrolysate, soy and conventional cow milk formulas on incidence of atopic disease in high risk infants.
Ann. Allergy, 63 .102-106.
- CHAPMAN M.D., HEYMAN P.W., WILKINS S.K. et al.** (1987)
Monoclonal immunoassays for major dust mite (dermatophagoides) allergens, Der p1 and Der f1, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts.
J.Allergy Clin. Immunol, 180, 184-194.

CHAPMAN M.D. (1988)

Allergen specific monoclonal antibodies : new tools for the management of allergic disease.
Allergy, 43, (suppl. 5), 7-14.

CHIBA H. and YOSHIKAWA M. (1986)

Biologically functional peptides from food proteins : new opioid peptides from milk proteins.
FEENEY et WHITAKER (eds). Protein Tailoring for Food and Medical Uses, Marcel DECKER, NY, 123-153.

CHRAMBACH A. (1985)

The practice of quantitative gel electrophoresis.
VCH Publ., Weinheim, 63-83.

CHURCH F.C., SWAISGOOD H.E. and CATIGNANI G.L. (1984)

Compositional analysis of proteins following hydrolysis by immobilized proteases.
J. Appl. Biochem., 6, 205-211

CHURCH F.C., PORTER D.H., CATIGNANI G.L. and SWAISGOOD H.E. (1985)

An 0-phthaldialdehyde spectrophotometric assay for proteinases.
Annal. Biochem., 146, 343-349.

CLINTON P.M., KEMENY D.M., AMLOT P., URBANEK R. and LESSOF M.H. (1986)

Histamine release from peripheral blood leucocytes in egg-allergic patients.
Clin. Allergy, 16, 345-354.

CODE C.F. (1968)

Alimentary canal.
Handbook of physiology, APS, Washington, 1277-1307.

COFFMAN R.L., OHARA J., BOND M.W. et Coll. (1986)

B cell stimulatory factor -1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells.
J. Immunol, 136, 4538-4541.

CONVERT C. and PAUPE J. (1988)

Hypersensibilité retardée.
PAUPE et SCHEINMANN (eds), Allergologie Pédiatrique Flammarion, Médecine Science, Paris, 83-88.

COOMBS R.R.A., DEVEY M.E. and ANDERSON K.J. (1978)

Refractoriness to anaphylactic shock after continuous feeding of cow's milk to guinea pigs.
Clin. Exp. Immunol., 32, 263-271.

COOMBS R.R.A., KIEFFER M., FRASER D.R. and FRAZIER P.J. (1983)

Naturally developing antibodies to wheat gliadin fractions and to other cereal antigens in rabbits, rats and guinea pigs on normal laboratory diets.
Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 70, 200-204.

DACOSTA Y. (1984)

L'Immunologie, Nouvel Outil d'Analyse en Agro-alimentaire.
Ed. Apria, Paris, 35-41.

DELESPESE G., SARFATI M. and HOFSTETTER H. (1989)

Human IgE binding factors.
Immunol. Today, 10, 159-164.

DENBURG J.A., TANNO Y. and BIENENSTOCK J. (1986)

Growth and differentiation of human basophils, eosinophils, and mast cells.
BEFUS et al (eds), Mast cell differentiation and heterogeneity. Rawen, N.Y., 71-83.

DODET B. (1989)

Allergie : Une cascade de réactions.
Biofutur, juillet-août, 25-32.

DOSCH H.M., SCHUURMAN R.K.B. and GELFAND E.W. (1980)

Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro. II. Reappraisal of T and B cell specific mitogens.
J. Immunol., 125, 827-832.

DROUET M. (1990)

Immunopathologie de l'asthme.
Allerg. Immunol., 22, 4, 125-130.

DRUGUET M. et ANDRE C. (1975)

Réponse proliférative spécifique des lymphocytes circulants induite chez le rat ingérant de l'ovalbumine.
Ann. Immunol. (Inst. PASTEUR J.), 126C, 475-479.

DUCROC R., HEYMAN M., BEAUFREFRE B., MORGAT J.L. and DESSEUX J.F. (1983)

Horseradish peroxidase transport across rabbit jejunum and peyer's patches in vitro.
Ann. J. Physiol, 245, G54-58.

DUPONT C., BARAU E., MOLKHOU P., RAYNAUD F., BABO J.P. and DEHENNIN L. (1989)

Food induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk sensitive enteropathy and atopic dermatitis.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 8, 459-465.

DURKIN H.G., BAZIN H. and WAKSMAN B.H. (1981)

Origin and fate of IgE bearing lymphocytes. I. Peyer's patches as differentiation site of cells simultaneously bearing IgA and IgE.
J. Exp. Med., 154, 640-648.

EDWARDS P.A.W. (1978)

Is mucous a selective barrier to macromolecules ?
Br. Med. Bull., 134, 55-56.

EL BARIN. (1989)

Etude de l'antigénicité de la caséine beta et ses produits de dégradation. Mise au point du dosage de la caséine beta dans le lait par immunonephélométrie sur support microparticulaire.

Thèse de doctorat de l'université de Nancy.

EL RAFEI A., PETERS S.M., HARRIS N. and BELLANTI J.A. (1989)

Diagnostic value of IgG4 measurements in patients with food allergy.

Ann. Allergy, 62, 94-99.

ELSAYED S. and AAS K. (1971)

Isolation and purification of allergens (cod) by isoelectric focusing.

Int. Arch. Allergy, 40, 428-438.

ELSAYED S., TITLESTAD K., APOLD J. and AAS K. (1980)

A synthetic hexadecapeptide derived from allergen M imposing allergenic and antigenic reactivity.

Scand. J. Immunol., 12, 171-175.

ELSAYED S. and APOLD J. (1983)

Immunochemical analysis of cod fish allergen M : Locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides.

Allergy, 38, 449-459.

ENERBACK L. (1966)

Mast cells in rat gastrointestinal mucosa.

Acta Path. Microbiol. Scand., 66, 289-302.

ENGVALL E. and PERLMAN P. (1971)

Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of Immunoglobulin G.

Immunochemistry, 8, 871-874.

FALLSROM S.P., UNDHOLM L. and AHLSTEDT S. (1983)

Cow's milk protein intolerance in children is connected with impaired lymphoblastic responses to mitogens.

Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 70, 205-210.

FINKELMANN F. D., KATOMA I.M., URBAN J.F. et al. (1986)

Suppression of in vitro polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 9675-9678.

FIRER M.A., HOSKINS C.S. and HILL D.J. (1981)

Effect of antigen load on development of milk antibodies in infants allergic to milk.

Br Med. J., 183, 693-696.

FREIER S., LEBENTHAL E., FREIER M., SHAH P.C., PARK B.H. and LEE P.C. (1983)

IgE and IgD antibodies to cow's milk and soy protein in duodenal fluid : effects of pancrozymin and secretin.
Immunology, 49, 69-75.

FREW A.J. and KAY A.B. (1988)

The relationship between infiltrating CD+ lymphocytes, activated eosinophils and the magnitude of the allergen. Induced late-phase cutaneous reaction in man.
J. Immunol., 141, 4158-4163.

FREW A.J. and KAY A.B. (1990)

Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions.
J. Allergy Clin. Immunol., 85, 3, 533-539.

FRORJANC IT. and ERJAVEC F. (1983)

Compound 48/80 and substance P induced release of histamine and serotonin from rat peritoneal mast cells.
Agents Actions, 13, 2-3.

GALLI S.J., DROVAK A.M. and DROVAK H.F. (1984)

Basophils and Mast cells : Morphologic insights into their biology, secretory patterns and function.
ISHIZAKA (ed), Prog. Allergy, 34, : Karger, 84,120.

GALLI S.J. (1987)

New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity and function.
Fed. Proc. , 4b, 1906-1919.

GARDNER M.L.G., LINDBLAD B.S., BARSTON D. and MATTHEWS D.M. (1983)

Transmucosal passage of intact peptides in the guinea-pig small intestine in vitro : a reappraisal.
Clin. Sci., 64, 433-439.

GAUTAM S.C. and BATTISTO J.R. (1985)

Orally induced tolerance generates an efferently acting suppressor T cell and an acceptor T cell that together down regulate contact hypersensitivity.
J. Immunol., 135, 2975-2983.

GERBER H.W. and JOST R. (1986)

Casein phosphopeptides : their effect on calcification of in vitro cultured embryonic rat bone.
Calcif Tissue Int., 38, 350-357.

GERVASONI J.E. Jr, CONRAD D.H., HUGLI T.E., SCHWARTZ L.B. and RUDDY S. (1986)

Degradation of human anaphylatoxin C3a by rat peritoneal mast cell : A role for secretory granule enzyme chymase and heparin proteoglycan.
J. Immunol., 136, 285-292.

GERVASONI J.E. Jr and RUDDY S. (1989)

Binding of human C3a and the synthetic nonapeptide C3a (tyr-70-77) to rat peritoneal mast cells.

TAUBER et al. (Eds). Biochemistry of the Acute Allergic Reactions. Fifth Inter Symp. Alan R. LISS, Inc, N.Y., 221-232.

GESPACH C, HERVATIN F, EMAMI S, CHASTRE E, CHATELET F, GARZON B, and DUROC R. (1987)

Effect of a milk diet on rat gastric mucosa: Receptor activity, histamine metabolism and ultrastructural analyses .

Agents Actions, 20, 265-268.

GIRARD J.P., GUMOWSKI P. and LACH B. (1983)

Analysis of mediators induced by sensitized lymphocytes responsible for bronchoconstriction. Folia Allergol Immunol. Clin., 30, 133-137.

GIRARDET J.M., MATI A., SANAGO T., ETIENNE L. and LINDEN G. (1991)

Fast Protein Liquid Chromatography purification of hydrophobic fraction of bovine milk proteose-peptone and characterisation by bidimensional electrophoresis.

J. Dairy Res. (accepté pour publication)

GIZIS E., KIM Y.P., BRUNNER J.R. and SCHWEIGERT B.S. (1965)

Vitamin B12 content and binding capacity of cow milk proteins.

J. Nutr., 87, 349-352.

GJESING B., OSTERBALLE O., SCHWARTZ B., WAHN U. and LOWENSTEIN H. (1986)

Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow's milk and milk substitutes.

Allergy, 41, 51-56.

GOLDMAN A.S., SELLARS W.A., HALPERN S.R., ANDERSON D.W., FURLOW T.E. and JOHNSON C.H. (1963)

Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins.

Pediatrics, 32, 572-579.

GUAN D., YOSHIOKA M, ERICKSON R.H., HEIZER W. and KIM YS. (1988).

Protein digestion in human and rat small intestine: role of new neutral endopeptidases.

Am. J. Physiol, 255, G212-G220.

GURKA G., OHMAN J. and ROSENWASSER L.J. (1989)

Allergen-specific human T cell clones : Derivation, specificity and activation requirements.

J. Allergy Clin. Immunol., 79, 933-940

HADDAD Z.H., KALRA S. and VERMA S. (1979).

IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of betalactoglobulin : Significance in food hypersensitivity.

Ann. Allergy, 42, 368-376.

HAEFFNER-CAVAILLON N., CAVAILLON J.M., LAUDE M. and KAZATCHKINE M.D. (1987)

C3a (C3 adversary) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes.

J. Immunol., 139, 794-799.

HALPERIN J.A., NICHOLSON-WELLER A., BRUGNARA C. and TOSTESON D.C. (1988)

Complement induces a transient increase in membrane permeability in unlysed erythrocytes.

J. Clin. Invest., 82, 594-600.

HAMBRAEUS L.(1985).

Importance of milk proteins in human nutrition:Physiological aspects.

GALESLOTT E.and TINBERGEN B.J.(eds) Milk Proteins 84 Proc. Int. Congress, Pudoc, Wageningen 63-79.

HAMMERSTEN O. (1883)

Zur frage ab das kasein ein heitlicher stoff sei.

Z. Physiol. Chem., 7, 227-273.

HANSON D.G. (1981)

Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns.

J. Immunol., 127, 1518-1524.

HARRABI S., LOISEAU P. and DEHENRY J. (1987)

Mise au point d'une technique de dégranulation des basophiles humains.

Allerg. Immunol., 19, 287-288.

HARRIS M.C., KOLSKI G.B., CAMPBELL D.E., DEUBER C., MARCUS M. and DOUGLAS S.D. (1989)

Ontogeny of the antibody response to cow milk proteins.

Ann. Allergy, 63, 439-442.

HAWKES R. (1982)

Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting.

Anal. Biochem., 123,143-146.

HEPPEL L.M.J., CANT A.J. and KILSHAW P.J. (1984)

Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment : a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula.

Br J. Nutr., 51, 29-36.

HEPPEL L.M.J., SISSONS J.W. and PEDERSEN H.E. (1987)

A comparaision of the antigenicity of soya-bean-based infant formulas.

Br. J. Nutr., 58, 393-403.

HERBERT B.S. and SCHWARTZ S.A. (1987)

Mucosal immunity : the immunology of breast milk.

J. Allergy Clin. Immunol., 80, 346-356.

HEYMANN M., BOUDRAA.G., SARRUT S., TOUHAMI M. and DESJEUX J.F. (1986)

Intestinal absorption of intact proteins. Effect of protein-energy malnutrition in children.

Malnutrition Pays Tiers Monde , INSERM (Colloque), 136, 269-275.

HEYMANN P.W., CHAPMAN M.D., and PLATTS-MILLS T.A.E. (1986)

Antigen Der f1 from the dust mite dermatophagoides farinae : structural comparison with Der p1 from *d. pteronyssinus* and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies.

J. Immunol. 137, 2841-2847.

HOFFMAN D.R. and HADDAD Z.H. (1974)

Diagnosis of IgE mediated immediate hypersensitivity to reactions to food antigens by radio immunoassay.

J. Allergy Clin. Immunol., 54, 165-169.

HOLEN E. and ELSAYED S. (1990)

Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography.

Int Arch Allergy Appl Immunol, 91, 136-141.

HOLGATE S.T., BURNS G.B., ROBINSON C. and CHURCH M.K. (1984)

Anaphylactic and calcium dependent generation of prostaglandin D2 (PG D2), thromboxane B2 and other cyclooxygenase products of arachidonic acid by dispersed human lung cells and relationship to histamine release.

J. Immunol., 133, 2138-2144.

HOLGATE S.T. and FINNERTY J.P. (1988)

Recent advances in understanding the pathogenesis of asthma and its clinical implications.

Q. J. Med., 249, 5-9.

HOLGATE S.T., BENYON R.C., LOWMAN M.A. and CHURCH M.K. (1989)

Activation of human mast cells after immunoglobulin E-dependent and neuropeptide stimulation.

TAUBER et al (Eds), Biochemistry of the Acute Allergic Reactions. Fifth Inter Symp, Alan R. LISS Inc., N.Y., 103-113.

HOPKIN J.M. (1989)

Genetics of atopy.

Clin. Exp. Allergy, 19, p. 263-265.

HORNICEK F.J., MALININ G.I., THORNTHWAITE J.T. and MALININ T.I. (1986)

Flow cytometry of blastogenesis and the concomitant viability assay of lymphocytes stained with 4,6-diaminino-2 phenylindole.

Bas. Appl. Histochem., 30, 453-461.

HUFF T.F. and ISHIZAKA K. (1984)

Formation of IgE binding factors by human T cell hybridomas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1514-1518.

HUSBY S., JENSENIUS J.C. and SVEHAG E.S. (1985)

Passage of undegraded dietary antigen into blood of healthy adults.
Scand. J. Immunol., 22, 83-92.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1986)

Consumption Statistics for milk and milk product.
Bulletin de la Fédération Internationale de Laiterie.

ISHIZAKA K. (1971)

Mechanisms of reaginic hypersensitivity.
Clin Allergy, 1, 9-24.

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T. and HORN BROOK M.M. (1966)

Physicochemical properties of human reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with E-globulin antibody.
J. Immunol., 97, 840-847.

ISHIZAKA K. (1985)

Twenty years with IgE : from the identification of IgE to regulatory factors for the IgE response.
J. Immunol., 135, 1-14.

ISHIZAKA K., JARDIEU P., AKASAKI M. and IWATA M. (1987)

T cells factors involved in the regulation of the IgE synthesis.
Int. Archs Allergy Appl. Immun., 82, 383-388.

ISHIZAKA T. and ISHIZAKA K. (1984)

Activation of mast cells for mediator release through IgE receptors.
Prog. Allergy, 34, 188-235.

ISHIZAKA T., IWATA M. and ISHIZAKA K. (1985)

Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin.
J. Immunol., 134, 3, 1880-1887.

JANOT C., HUMBERT J.C., VAUTRIN D.A., PUPIL P. et DE LAVERGNE E. (1970)

Le test de transformation lymphoblastique : son principe, sa réalisation pratique, ses applications.
Rev. Med., 29, 1673-1387.

JARRET E.E.E. and MILLER H.R.P. (1982)

Production and activities of IgE in helminth infections.
Prog. Allergy, 31, 178-233.

JOHANSSON S.G.O. and BENNICH H. (1967)

Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin.
Immunol., 13, 381-386.

JOHNSON A.R., HUGLI T.E. and MULLER-EBERHARD H.J. (1975)

Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a.
Immunol., 28, 1067-1080.

JOST. R. (1988)

Physicochemical Treatment of food allergens : Application to cow's milk proteins.
SCHMIDT E., (ed). Food Allergy. NNWS, 17, Nestec Ltd, N.Y., 187-197.

KEMENY D.M., URBANEK R., AMLOT P.L., CICLITIRA P.J., RICHARDS D., and LESSOF M.H. (1986)

The subclass of IgG in allergic disease : I. IgG subclass antibodies in immediate and non-immediate food allergy.
Clin. Allergy, 16, 571-581.

KILSHAW P.W. and SLADE H. (1980)

Passage of ingested protein into the blood during gastrointestinal hypersensitivity reactions: experiments in the preruminant calf.
Clin. Exp. Immunol 41, 477-481.

KILSHAW P.J. and CANT A.J. (1984)

The passage of maternal dietary proteins into human breast milk.
Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 75, 8-15.

KLEIMAN R.E., BLOCH K.J. and WALKER W.A. (1981)

Gut induced anaphylaxis and uptake of a bystander protein : an amplification of anaphylactic sensitivity.
Pediatr. Res., 15, 598-604.

KUVIBIDILA S. (1986)

Atteinte de l'immunité à médiation cellulaire par carence en fer dans un modèle animal (la souris).

LEMONNIER D., et INGENBLEEK Y., (eds). Les malnutritions dans les pays du Tiers-Monde, Colloque INSERM, 136, p. 319-332.

LAEMMLI U.K. and FAVRE M. (1973)

Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events.
J. Mole. Biol., 80, 575-581.

LAKE A.M. (1983)

Experimental models for the study of gastrointestinal food allergy.
Ann. Allergy, 51, 226-228.

LAMY M., NEZELOF C., JOS J., FREZAL J. et REY J. (1963)

La biopsie de la muqueuse intestinale chez l'enfant. Premiers résultats d'une étude des syndromes de malabsorption.

Presse Med., 71, 1267-1270.

LEE T.H. and ARM J.P. (1989)

Modulation of the Allergic Response by fish oil lipids and eicosatrienoic acid. TAUBER et al (Eds), Biochemistry of the Acute Allergic Reactions.

Fifth Inter Symp, Alan R. LISS Inc, N.Y., 57-69.

LEE Y.S., NOGUCHI T. and NAITO H. (1979)

An enhanced intestinal absorption of calcium in the rat directly attributed to dietary casein.

Agric. Biol. Chem., 43, 2009-2011.

LEHNINGER A.L. (1970)

Biochimie. Traduction par P. CARTIER.

Flammarion Publ., France, 434-438.

LELONG M., FAUQUERT J.L, BRAS C. and THELLIEZ P. (1986)

Comparaison des dosages des IgE spécifiques vis-à-vis des diverses protéines du lait chez 76 enfants eczémateux.

Allerg. Immunol., 18 , 28-30.

LESAURE P. (1986)

Le complément.

CHARPIN (Ed), Allergologie, Flammarion-Médecine, Science, Paris, 121-124.

LESSOF M.H., KEMENY D.M. and AMLLOT P.L. (1987)

The investigation of food intolerance.

CHANDRA R.K.,(ed) Food Allergy, N.R.E.F. New Foundland. 7-17.

LEVINE B.B. and VAZ N.M. (1970)

Two kinds of genetic control of reagin production in the mouse.

J. Clin - Invest., 49, 58-62.

LEWIS R.A., SOTER N.A., DIAMOND P.T., AUSTEN K.F., OATES J.A. and ROBERTS L.J. (1982)

Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE.

J. Immunol, 129, 1627-1631.

LEWIS R.A., (1989)

Effect of leukotrienes on the biology of inflammatory cells .

TAUBER et al (eds). Biochemistry of the Acute Allergic Reactions : Fifth International Symposium, Alan R .Liss,Inc,NY, 19-26.

LITTAUER U.Z., GIVEON D., THIERAUF M., GINZBURG I. and PONSTINGL H. (1986)

Common and distinct tubulin binding-sites for microtubule associated proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7162-7166.

LOEHRY C.A., AXON A.T.R., HILTON P.J., HIDER R.C. and CREAMER B. (1970)
Permeability of the small intestine to substances of different molecular weight.
Gut, 11, 466-470.

LOWRY O.H., ROSEBROUCH H.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-271.

MAC DONALD A. (1988)
Cow's milk allergy and intolerance.
J. Soc. Dairy Technol 41, 3, 66-67.

MACDONALD T.T. (1990)
The role of activated T Lymphocytes in gastrointestinal disease.
Clin. Exp. Allergy, 20, 247-252.

MACHTINGER S. and MOSS R. (1986)
Cow's milk allergy in breast feed infants : the role of allergen and maternal secretory IgA antibody.
J. Allergy Clin. Immunol., 77, 341-347.

MALIK Z., BOTTOMLEY R. and AUSTEN B. (1988)
Allergenic properties of the genetic variant A and B of bovine bêta-lactoglobulin.
Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 86, 245-248.

MALO C. and MORIN C.L. (1986)
Establishment of an animal model of ovalbumin sensitized mouse to study protein-induced enteropathy.
Gut, 27, 11, 1298-1305.

MARCON-GENTY D., TOME D., KHEROUA O., DUMONTIER A.M., HEYMAN M. and DESJEUX J.F. (1985)
Transport of bêta-lactoglobulin across rabbit ileum in vitro.
Am. J. Physiol., 256, G 943-948.

MARSH D.G., GOODFRIEND L. and BIAS W.B. (1977)
Basal serum IgE levels and HLA antigen frequencies in allergic subjects. Studies with raqweed allergen Ra 3.
Immunogenetics, 5, 235-340.

MARTOJA R. et MARTOJA M. (1967)
Initiation aux techniques de l'histologie animale.
Masson et cie, Paris, 300-321

MARUYAMA S., MITACHI H., AWAYA J., KURONO M., TOMIZUKA N., and SUZUKI H (1987a)
Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of S1-casein.
J. Agric. Biol. Chem., 51, 2557-2561.

MARUYAMA S., MITACHI H., TANAKA H., TOMIZUKA N., and SUZUKI H. (1987b)

Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein.

J. Agric. Biol. Chem. 51, 1581-1586.

MATTHEWS D.M. (1975)

Intestinal absorption of peptides.

Physiol. Rev., 55, 147-152.

MEISEL V.H. and HAGEMEISTER V.H. (1987)

Postprandial proteolysis van casein und sojaprotein.

Milchwissenschaft, 43, 3, 158.

MEISEL H., FRISTER H. (1989)

Chemical characterization of bioactive peptides from in vitro digests of casein.

J. Dairy Res., 56, 343-349.

MELAUGHLAN P., ANDERSON K.J., WIDDOWSON E.M. and COOMBS R.R.A. (1981)

Effect of heat on the anaphylactic-sensitizing capacity of cow's milk, goat's milk, and various infant formula fed guinea pigs.

Arch. Dis. Child., 56, 165-171.

MENDY F., BRACHFOGEL N. and SPIELMANN D. (1981)

Actualités dans le domaine de la connaissance, de l'utilisation digestive et métabolique en nutrition humaine des protéines lactières.

Revue Laitière Française, 400, 37-58.

MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. and RIBADEAU-DUMAS B. (1971)

Structure primaire de la caséine alpha-S 1 bovine.

Eur. J. Biochem., 23, 45-51.

MERCIER J.C. and GAYE P. (1982)

Early events in secretion of main milk proteins : Occurrence of precursors.

J. Dairy Sci., 65, 299-316.

METZGER H., GOETZE A., KANELLOPOULOS J, HOLOWKA D, and FEWTRELL G. (1982)

Structure of the high-affinity mast cell receptor for IgE.

Fred. Proc. 41, 8-12.

METLER M., BELITZ H.D., GELLERMANN B., WIESER H. and STERN M. (1988)

Handing of gliadin peptides B1-B4 and of cow's milk proteins by rat jejunum gut sacs.

J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 7, 2, 196-202.

MIGLIORE-SAMOUR D., FLOCH F. and JOLLES P. (1989)

Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation.

J. Dairy Res., 56, 357-362.

MIRANDA G. and PELISSIER J.P. (1981)

In vitro studies on the digestion of bovine caseins in the rat stomach.
J. Dairy Res., 48, 319.

MITCHELL M.S., KIRKPATRICK D., MOKYR M.B. and GERYI. (1973)

On the mode of action of BCG.
Nature New Biol., 243, 216-222.

MODDLEY I. and MONGAR J.L. (1981)

Histamine and Immunology. IgG receptors on the mast cells.
Agents Actions, 11,77-80.

MONERET-VAUTRIN A., HUMBERT G., ALAIS C. et GRILLIAT J.P.

(1982a)
Données récentes sur les propriétés immunoallergologiques des protéines laitières.
Le Lait, 62, 396-408.

MONERET-VAUTRIN A., EL HAMOUI A.K., HUMBERT G., JANOT C. et GERARD H. (1982b)

Etude de la réponse immunitaire IgM, IgG et IgE spécifiques à la bêta-lactoglobuline saccharosée chez le lapin.
Le Lait, 62, 415-426.

MONERET-VAUTRIN D.A. (1983)

Allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires.
Fond. Fr. Nutr., 19, 13-27.

MONERET-VAUTRIN D.A. (1986)

Food antigens and additives.
J. Allergy Clin. Immunol., 78 (5), 1039-1046.

MORITA Y., GORO M. and MIYAMOTO T. (1987)

Effect of interleukin 2 on basophil histamine release.
Allergy, 42, 104-108.

MOWAT A. Mc (1986)

Depletion of suppressor T cells by 2'-deoxyguanosine abrogates tolerance in mice fed ovalbumin and permits the induction of intestinal delayed-type hypersensitivity.
Immunol., 58, 179-184.

MOWAT A. Mc (1987)

The regulation of immune responses to dietary protein antigens.
Immunol. Today, 8, 93-98.

MOWAT A.M.C., LAMONT A.G. and BRUCE M.G. (1987)

A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due to failure of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen.
Eur. J. Immunol., 17, 1673-1676.

MULLER-EBERHARD H.J., POLLEY M.J. and CALCOTT M.A. (1967)

Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and fourth component of human complement.

J. Exp. Med., 125, 359-380.

MYKKANEN H.M. and WASERMAN R.H. (1980)

Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks.

J. Nutr., 110, 2141-2148.

NABET P. (1961)

Contribution à l'Etude du Facteur Intrinsèque dans le Suc Gastrique Humain : Dosage, Nature, Physiologie, Pathologie.

Thèse, Université de NANCY I.

NEMETH A. and ROHLICH P. (1980)

Rapide separation of rat peritoneal mast cells with Percoll.

Eur. J. Cell. Biol., 20, 272-275.

NG-KWAI-HANG K.F. and KROEKER E.M. (1984)

Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Dairy Sci., 67, 3052-3059.

NITSCHMANN H.L. und LEHMANN W. (1947)

Zum problem der labwirkung auf casein.

Helv. Chim. Acta., 30,804-815.

NOMA T., YOSHIZAWA I., MAEDA K., ICHIKAWA K., BABA M., and YATA J. (1989)

Allergen-specific induction of interleukin-2 (IL-2) responsiveness in lymphocytes from children with asthma.

J. Allergy Clin. Immunol., 84, 255-262.

NYGREN H. and STENBERG M.(1989)

Immunology at interfaces.

Immunology, 66, 321-327.

OTANI H., IWASAKI S. and TOKITA F. (1984)

Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. III. Antigenic reactivity of peptide 1-93 with antiserum to β -casein.

Milchwissenschaft, 39, 7, 396-403.

OTANI H., IWASAKI S. and TOKITA F. (1984)

Studies on the antigenic structure of bovine β -casein. I. Antigenic reactivity of β -casein-III with antiserum to β -casein.

Milchwissenschaft, 39, 4, 211-216.

OTANI H., MORITA S.O. and TOKITA T. (1985)

Studies on the antigenicity of the browning product between β -lactoglobulin and lactose
Antigenic activities of peptides 25-61 and 62-107.
Jpn.J. Zootech. Sci., 56, 12, 341-347.

OTANI H., MORITA S.I. and TOKITA F. (1985)

Studies on the antigenicity of the browning product between β -Lactoglobulin and lactose :
Antigenic activities of peptides obtained by cleavage at arginine peptide bonds in regions 25-
107 and 108-145.
Jpn. J. Zootech. Sci., 5, 987-995.

OTANI H., TAKAYAMA K. and TOKITA F. (1985)

Antigenic identity of bovine s1 and s1-I caseins.
Milchwissenschaft, 40, 1, 24-29.

OTANI H., TAKAYAMA K. and TOKITA F. (1986)

Studies on the antigenicity of bovine s1-casein : Antigenic activity of some peptides derived
from the C-terminal region.
Milchwissenschaft, 41, 9, 565-571.

OTANI H. and HOSONO A. (1987)

The immunochemical properties of bovine beta casein digested with trypsin and /or V8
protease from Staphylococcus Aureus.
Jpn. J. Zootech. Sci. 58,7,618-627.

OTANI H., DONG X.Y., HARA T., KOBAYASHI M., KAYAHARA H. and HOSON A. (1989)

Human serum antibodies to cow milk proteins in infants and children having clinically
allergic symptoms.
Milchwissenschaft 44, 131-134.

OKOMURA K. and TADA T. (1971)

Regulation of homocytropic antibody formation in the rat. III. Effect of thymectomy and
splenectomy.
J. Immunol., 106, 1019-1023.

PAGANELLI R., FAGIOLO U., CANSIAN M., STURNIOLO G.C., SCALA E. and D'OFFIZI G.P. (1990)

Intestinal permeability in irritable bowel syndrome. Effect of diet and sodium cromoglycate
administration.
Ann. Allergy, 64, 377-379.

PAGANELLY R. and LEVINSKY R.J. (1980)

Solid phase radioimmunoassay for detection of circulating food proteins antigens in human
serum.
J. Immunol. Methods, 37, 333-341.

- PAHUD J.J., MONTI J.C. and JOST R. (1985)**
Allergenicity of whey protein : its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein.
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 4, 408-416.
- PAHUD J.J., SCHWARZ K. and GRANATO D. (1988)**
Control of hypoallergenicity by animal models.
SCHMIDT E.,(ed).Food Allergy. NNWS, 17, Nestec Ltd, N.Y., 199-207.
- PAROLI E. (1988)**
Opioid peptides from food (the exorphins).
Wld Rev Nutr Diet ,55, 58-97.
- PATRICK M.K., DUNN I.J., BURET A., MILLER H.R.P., HUNTLEY J.F., GIBSON S. and GALL D.G. (1988)**
Mast cell protease release and mucosal ultrastructure during intestinal anaphylaxis in the rat.
Gastroenterology, 94, 1-9.
- PAUPE J. (1988a)**
Ontogénie du système immunitaire et classification des phénomènes allergiques.
PAUPE et SCHEINMANN (Eds), Allergologie Pédiatrique, Flammarion Médecine Sciences, Paris, 3-9.
- PAUPE J. (1988b).**
Allergie alimentaire.
PAUPE et SCHEINMANN (eds) Allergologie pediatrique Flammarion, Medecine Science Paris,367-377.
- PAUPE J. and SCHEINMANN P. (1988)**
Exploration immuno-allergique in vitro.
PAUPE et SCHEINMANN (Eds). Allergologie Pediatrique,Flammarion Médecine Science, Paris, 130-141.
- PELLISSIER J.P. (1984)**
Protéolyse des caséines
Sci. Aliments 4 ,1-35.
- PETRUS M., NETTER J.C., CHATEAUNEUF R., BILDSTEIN G., FRANCE F., DUTHOIT G. and BERNET I. (1989)**
Syndrome de rescapé de mort subite et allergie aux protéines du lait (à propos d'une observation).
Allerg. Immunol., 21, 2, p. 77-78.
- PHILLIPS L.,CHAMBERS C., UNDERDOWN B.J. and ZIMMERMAN B. (1987)**
Lymphocyte proliferation to antigen E : Demonstration of restriction of antigen E-specific T-cells to ragweed-allergic donors.
J. Allergy Clin. Immunol.,79, 933-940.

PLATTS-MILLS TAE., HEYMANN P.N., CHAPMANN M.D., HAYDE M.L. and WILKINS S.R. (1986).

Cross-reacting and species specific epitopes on a major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D farinae* : development of radioimmunoassay for antigen P1 equivalent in house dust and mite extracts.

J. Allergy Clin. Immunol, 78,3998-4007.

PLEBANI A., ALBERTINI A., SCOTTA S. and UGAZIO A.G. (1990)

IgE antibodies to hydrolysates of cow milk proteins in children with cow milk allergy.

Ann. Allergy 64, 279-280.

POIFFAIT A. and ADRIAN J. (1986)

Les caractéristiques nutritionnelles de la caséine.

Industries Alimentaires et Agricoles, 335-341.

PROUVOST-DANON A. (1986)

Phénomène d'ARTHUS.

CHARPIN (Eds), Allergologie, Flammarion-Médecine Science., Paris, 121-124.

RAGHUBIR P.S. (1981)

Immunologic considerations in toxicology.

C.R.C. Press., 134-137.

RALFKIAER E. and WANTZIN G.L. (1984)

In situ immunological characterization of the infiltrating cells in positive patch test.

Br J. Chem., 3,13-22.

RAZIN E., CORDON-CARDO C, and GOOD R.A. (1981)

Growth of a pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78,4, 2559-2561.

REVILLARD J.P., LAFONT S. and KAISERLIAN D. (1988)

Regulation of mucosal immunity : an overview with special emphasis on secretory IgA production and oral tolerance.

SCHMIDT E.,(ed) Food Allergy. NNWS, 17, Nestec Ltd, N.Y., 35-50.

RERAT A., SIMOES-NUNES C., MENDY F. and ROGER L.(1988)

Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids.

Br. J. Nutr., 60, 121-136.

RIBADEAU-DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F. and MERCIER J.C.

(1972)

Structure primaire de la caséine bêta. Séquence complète.

Eur. J. Biochem., 25, 505-514.

RIBADEAU-DUMAS B. (1987)

Les proteines .

Le lait matière première de l'industrie laitière.CEPIL, INRA, Paris, 63-85.

RICCI M., DEL-PRETE F., MAGG E., VERCELLI D. and ROMAGNINI S. (1986)

Regulation de la synthèse des IgE.

CHARPIN (Ed), Allergologie. Flammarion, Paris, 93-100.

RIDAUT C.L., WHARF S.G., PRICE K.R., JOHNSON I.T. and FENWICK G.R. (1988)

U.K. mean daily intakes of saponins - Intestine permeabilising factors in legumes.

Food Sci. Nutr., 42 F, 2, 111-116.

RIHOUX J.P. (1988)

Comprendre l'allergie.

Allerg. Immunol., 20,(suppl. 10), 5-16.

ROIT I., BROSTOFF J. and MALE D. (1985)

Immunologie fondamentale et appliquée. MEDSI, Paris. 19-22.

RUFF G. and SANTAIS M.C. (1988)

Les récepteurs H1 et H2 de l'histamine.

Allerg. Immunol., 20, 9, 317-325.

SAID H.M.,GHISHAN F. K. and MURRELL J. E..(1985)

Ontogenesis of intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate in the rat.

Am. J. Physiol. 299, G507-G571

SAID H.M., ONG D. and REDHA R. (1988)

Intestinal uptake of retinol in suckling rats: characteristics and ontogeny.

Pediatr. Res. 24,481-485.

SAMPSON H.A. and JOLIE P.L. (1984)

Increased plasma histamine concentrations after food challenges in children with atopic dermatitis.

New Engl. J. Med., 311, 372-376.

SANOGO T.T. (1988)

Etude de l'activité des protéases dans un milieu complexe : application au modèle caséine alpha S1-papaine en milieu salin.

Thèse, Université de NANCY I

SARYAN J.A., LEUNG D.Y.M. and GEHA R.S. (1983)

Induction of human IgE synthesis by a factor derived from T cells of patient with hyper-IgE states.

J. Immunol, 130, 242-247.

SATO R., NOGUCHI T. and NAITO H. (1986)

Casein phosphopeptide (CCP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine.

J. Nutr. Sci. Vitaminol, 32, 67-76.

SAURAT J. H., BEUCHER F. et PAUPE J. (1978)

Faut-il encore utiliser le test de transformation lymphoblastique pour le diagnostic des allergies médicamenteuses?

Nouv Press Méd., 20, 194-199.

SAVILAHTI E. and VERKASALO M. (1984)

Intestinal cow's milk, Allergy: Pathogenesis and clinical presentation.

Clin. Rev. Allergy, 2, 7-23.

SCHEINMANN P. and PAUPE J. (1988)

Hypersensibilité immédiate.

PAUPE et SCHEINMANN (eds), Allergologie pédiatrique, Flammarion, Médecine Science Paris, 18-26.

SCOTT M.T. (1972)

Biological effects of the adjuvant *Corynebacterium parvum*. I. Inhibition of PHA, mixed lymphocyte and GVH reactivity.

Cell. Immunol., 5, 459-464.

SHAKIB F. (1986)

The IgG4 Subclass.

Monogr Allergy, 19, Karger, Basel, 223-226.

SHOWELL H.J., GLOUSKY M.M. and WARD P.A. (1982)

C3a-induced lysosomal enzyme secretion from human neutrophils.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol, 67, 227-232.

SILK D.B.A., MARRS T.C., CLEGG K.M., ADDISON J.M., BURSTON D., CLARK M.L. and MATTHEWS D.M. (1973)

Absorption of amino acids from an amino acids mixture stimulating casein and a tryptic hydrolyse of casein in man.

Clinical Sci. and Mole Med., 45, 715-719.

SIRAGANIAN R.P. and HAZARD K.A. (1979)

Mechanisms of mouse mast cell activation and inactivation for IgE mediated histamine release.

J. Immunol., 122, 1719-1725.

SJOLANDER A., MAGNUSSON K.E. and LATKOVIC S. (1984)

Effect of concanavalin A and wheat germ agglutinin on the ultrastructure and permeability of rat intestine. A possible model for an intestinal allergic reaction.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 75, 230-236.

SJOELANDER A. and MAGNUSSON K.E. (1987)

Effects of antigen challenge on intestinal permeability and morphology in rats immunized with gliadin or ovalbumin.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 84, 284-290.

SONG I.S., YOSHIOKA M., ERICKSON R.H., MIURA S. and GUAN D. (1986)

Identification and characterisation of brush-border membrane-bound neutral metalloendopeptidases from rat small intestine.

Gastroenterology 91, 1234-1242.

SPIES J.R., STEVENS M.A. and STEIN W.S. (1969)

The chemistry of allergens : new antigens generated by pepsin hydrolysis of bovine milk protein.

J. Allergy, 45, 208-212.

STERN M.S., PANG K.Y. and WALKER W.A. (1984)

Food proteins and gut mucosal barrier. II. Differential interaction of cow's milk proteins with the mucous coat and the surface membrane of adult and immature rat jejunum.

Pediatr. Res., 18, 1252-1257.

STOTT D.I. (1989)

Immunoblotting and dot blotting.

J. Immunol. Methods, 119, 153-187.

STROBEL S. and FERGUSON A. (1984)

Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age which antigen is first encountered.

Pediatr. Res., 18, 588-594.

SWAISGOOD H.E. (1982)

Chemistry of milk proteins.

FOX (Ed). Developments in Dairy chemistry. I. Development series, Appellon Sci. Publ., London, 1-59.

SWIETER M., LEE T.D.G., STEAD R.H., FUJIMAKI H. and BEFUS D. (1987)

Mast cell pleomorphism : properties of intestinal mast cells.

Adv. Exp. Med. Biol., 216 A, 613-623.

TAINIO V.M. and SAVILAHTI E. (1987)

Cow's milk specific antibodies, stimulation of lymphocytes, lymphocytes subsets, serum immunoglobulins and complement fractions in cow's milk allergy.

CHANDRA, R.K.,(ed) .Food Allergy. NREF, Newfoundland, 161-166.

TAINIO V.M. and SAVILAHTI E. (1990)

Value of immunologic tests in cow milk allergy.

Allergy, 45, 189-196.

TAKAHASHI T., KAMINOGAWA S., KUWATA Y., ANDO O. and YAMAUCHI K. (1988)

Tcell recognition of beta-lactoglobuline.
Agric. Biol. Chem. 52,2485-2491.

TAKASE M., FUKUWATARI Y., KAWAKASE K., KIYOSAWA I. OSAWA K., SUZUKI S. and KUROUME T. (1979)

Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate.
J. Dairy Sci. 62, 1570-1578.

TASAKA K., AKAGI M. and MIYOSHI K. (1986)

2.Histamine release. Distribution of actin filaments in rat mast cells and its role in histamine release.
Agents Actions, 18 1/2, 49-52.

TAYLOR S.L., LEMANSKE Jr. R.F., BUSH R.K. and BUSSE W.W. (1987)

Chemistry of food allergens.
CHANDRA R.K., (ed) Food Allergy, NREF, New-Foundland. 21-44.

TERPSTRA A.H.M., WOODWARD C.J.N., WEST C.E. and VAN BOVEN H.G. (1982)

A cross-over study of serum cholesterol and lipoproteins in rabbits fed semipurified diets containing either casein or soybean protein.
Br. J. Nutr., 47, 215-221.

TESCHEMACHER H. (1987).

Casein derived opioid peptides : physiological significance?.
Adv Biosci 65, 41-48.

THEOBALD K., GROB-WEEGE W., KEYMLING J. and KONIG W. (1987)

Inhibition of histamine release in vitro by a blocking factor from human serum : comparison with the iron binding proteins, transferrin and lactoferrin.
Agents Actions, 20, 10-16.

TORRE P.M. and OLIVER S.P. (1989)

Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells by bovine mammary secretions.
J. Dairy Sci., 72, 219-227.

TRIEU-CUOT P. (1981)

Etude des caséines et leurs produits de dégradation par méthodes électrophorétiques. Application à l'étude de l'affinage du camembert.
Thèse doctorat 3è cycle, Université Paris-Sud.

TURNER M.W. (1988)

Perméabilité aux sucres dans l'anaphylaxie intestinale chez les rats. .
Allerg. Immunol., 20, 3, 99.

- UDALL J.N., PANG K., FRITZE L., KLEINMAN R., TRIER J.S. et al. (1981)**
Development of gastrointestinal mucosal barrier. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules.
Pediatr. Res., 15, 241-244.
- UEDE T. and ISHIZAKA K. (1982)**
Formation of IgE binding factors by rat T lymphocytes. Cellular mechanisms for the formation of IgE potentiating factor and IgE suppressive factor by antigenic stimulation of antigen-primed spleen cells.
J. Immunol. 129, 1391-1397.
- UKABAM S.O. and COOPER B.T. (1984)**
Small intestinal permeability to mannitol, lactulose and polyethylene glycol 400 in celiac disease.
Dig. Dis. Sci., 29, 809-816.
- URBANEK. R. and KEMENY M.D. (1988)**
IgG and IgG subclasses response to dietary antigens in patients with immediate and non immediate food allergy.
SCHMIDT E.,(ed). Food Allergy, NNWS, 17, Nestec Ltd, N.Y., 71-80.
- VAN SICKLE G.J., POWELL G.K., MCDONALD P.J. and GOLDBLUM R.M. (1985)**
Milk and soy protein induced enterocolitis : evidence for lymphocytes sensitization to specific food proteins.
Gastroenterology, 88, 1915-1921.
- VENTURA A., LONGO G. and TAMBURLINI G. (1981)**
Reaginic hypersensitivity to cow's milk proteins.
Helv Ped. Acta., 36, p. 237-241.
- VENTURA A. and GRECO L. (1986)**
Italian Working Group on Cow's milk Protein Allergy of the Italian Society of Pediatrics (1988). Cow's milk allergy in the first year of life.
Acta. Pediat. Scand. Suppl., 348, 1-14.
- VERCELLI D., and GEHA R.S. (1989)**
The IgE system.
Ann. Allergy, 63, 4-8.
- VISAKORPI J.K. (1988)**
Food Allergy and the gut.
SCHMIDT E.,(ed). Food Allergy, NNUWS, 17, Nestec Ltd, N.Y., 137-149.
- VUITTON D. et SEILLES E. (1989)**
Immunologie intestinale et allergie alimentaire. Résumé de la réunion de la société française de dermatologie et de syphiligraphie. L'allergie alimentaire.
Aller. Immunol. 21, 319.

WAHN U. and GANSTER G. (1982)

Cow's milk proteins as allergens.

Eur.J.Pediatr. 138, 94-100.

WAHN U. (1988)

Antigens in cow's milk and hen's egg allergy.

SCHMIDT (Ed).Food Allergy, Nestec Ltd, N.Y., 81-88.

WALKER-SMITH J.A. (1982)

Cow's milk intolerance as a cause of postenteritis diarrhoea.

J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 1, 163-173.

WALKER W.A. (1988)

Transmucosal passage of antigens.

REINHARDT and SCHMIDT (eds), Food Allergy, Raven Press, N.Y., 15-34.

WECK AL. (1986)

Hypersensibilité retardée.

CHARPIN (Ed), Allergologie, Flammarion Médecine, Science, Paris, 134-140.

WECK A.L. (1988)

Immunologic Diagnostic Tests in food allergy.

SCHMIDT E. (ed), Food Allergy, Nestec, N.Y., 177-186.

WELLER-NICHOLSON A. and HALPERIN J.A. (1989)

Mechanisms by which the erythrocyte protects itself from complement damage.

TAUBER et al (Eds), Biochemistry of the Acute Allergic Reactions, Fifth Inter Symp, Alan R. LISS Inc, N.Y., 263-271.

WEST C.E. and BEYNEN A.C. (1985)

Milk proteins in contrast to plant proteins :Effects on plasma cholesterol.

GALESLOOT and TINBERGEN (Ed), Milk Proteins'84, Proc. Int. Congress MP, Pudoc Wageningen, 80-87.

WEST G.B., (1986)

Plenary lecture "Mast Cells Revisited".

Agents Actions, 18 (1/2). 5-18.

WILSON N.W., SELF T.W. and HAMBURGER R.N. (1990)

Severe cow's milk induced colitis in an exclusively breast-fed neonate.

Clin. Pediatr., 29, 77-80.

WOLF R., NABET P. et DAVID F. (1964)

L'utilisation de l'autohistoradiographie pour l'étude de l'absorption intestinale de la vitamine B12.

C.R.Soc Biol.,158,869-973.

WOLFROMM R. (1972)

Techniques en Allergie.

Flammarion Médecine-Science, Paris, 79-85.

ZIEGLER E.E., FOMON S.J., NELSON S.E., REBOUCHE C.J., EDWARDS B.B., ROGERS R.R. and LEHMAN L.J. (1990)

Cow milk feeding in infancy. Further observations on blood loss from the gastro-intestinal tract.

J. Pediatr., 116, 11-18.

ZIOUDRU C., STREATY R.A., KLEE W.A. (1979)

Opioid peptides derived from food proteins : the exorphins.

J. Biol.Chem.254, 2446-2449.

ZWEIMAN B. (1988)

Mediators of allergic inflammation in the skin.

Clin. Allergy, 18, 419-423.

ANNEXES

1. Composition de l'aliment * RATS - SOURIS EXTRALABO

● Blé tendre	52,6
● Maïs	3,5
● Tourteau de soja 50	13,5
● Farine de viande (60 % protéine)	6
● Farine de poisson (Norvège)	7
● Son de blé	4
● Levure de bière	2,5
● Suif 1 ^{er} jus	1,5
● Huile de maïs	1
● Luzerne déshydratée	2
● Mélasse	3
● Phosphate bicalcique d'os	1,4
● Carbonate de chaux	1,1
● Sel	0,4
● Premix vitamines + OE	0,5
	100

* granulométrie des composants < 1 mm avant mélange.

2. Supplémentation en vitamines dans le régime non stérilisable (au kg aliment)

	supplémentation	provenance
A	37 500 UI	Vit. A 500 000 enrobé Rhône Poulenc
D ³	2 000 UI	D ³ 200 000 UI Rhône Poulenc
E	40 mg	Acétate de tocophérol
K ³	4 mg	Bisulfite sodique de menadione
B ¹	15 mg	Chlorydrate de thiamine
B ²	8 mg	Riboflavine
B ³	20 mg	D Pantothénate de calcium
B ⁶	8 mg	Chlorydrate de pyridoxine
B ¹²	70 mcg	Cyanocobalamine diluée 1/1000
PP	50 mg	Acide nicotinique
Acide folique	2 mg	
Choline	1 250 mg	Chlorure de choline 70 %

ANNEXE 2 : TAMPONS DE TYRODE

Composant	mM
NaCl	137
NaHCO ₃	12
Glucose	5,6
KCl	2,7
NaH ₂ PO ₄	0,4
MgCl ₂	1
CaCl ₂	1,8

pH : 7,2 -7,4

Osmolarité : 315 - 316

TAMPONS DE TYRODE - ASB - HEPES :

- Tampons de Tyrode
- HEPES : 10 mM
- ASB* : 0,1 %

* : Albumine sérum bovin

ANNEXE 3. Milieu RPMI 1640¹

041-01875	
1X Liquide:	
Composant	mg/L
SELS INORGANIQUES:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100.00
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhvd.)	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100.00
MnSO ₄ · H ₂ O	—
NaCl	6000.00
NaHCO ₃	2000.00
Na ₂ HPO ₄ (anhvd.)	—
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	1512.00
AUTRES COMPOSANTS:	
D-Glucose	2000.00
Glutathion (réduit)	1.00
HEPES	—
Rouge de Phénol	5.00
ACIDES AMINES:	
L-Arginine (base libre)	200.00
L-Asparagine	50.00
Acide L-Aspartique	20.00
L-Cystine	50.00
L-Cystine · 2HCl	—
Acide L-Glutamique	20.00
L-Glutamine	300.00
Glycine	10.00
L-Histidine (base libre)	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine (sans allo)	50.00
L-Leucine (sans méthionine)	50.00
L-Lysine · HCl	40.00
L-Méthionine	15.00
L-Phénylalanine	15.00
L-Proline (sans Hydroxy L-proline)	20.00
L-Sérine	30.00
L-Thréonine (sans allo)	20.00
L-Tryptophane	5.00
L-Tyrosine	20.00
L-Tyrosine (sel disodique)	—
L-Valine	20.00
VITAMINES:	
Biotine	0.20
Pantothénate de Calcium D	0.25
Chlorure de Choline	3.00
Acide Folique	1.00
i-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Acide Para-aminobenzoïque	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavine	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamine B ₁₂	0.005

ANNEXE 4. T E S T E L I S A

=====

- REACTIFS

- . PBS, fabrication Hôpital Central :
 - NaCl 8000 mg
 - KCl 200 mg
 - Na₂HPO₄ 2H₂O .. 1440 mg
 - KH₂PO₄ 200 mg
 - qsp 1 l H₂O

- . 1er anticorps : selon le dosage à effectuer
- . H₂O₂ : perhydrol MERCK
- . BSA : Fraction V Difco 0497-12 - 10 g de BSA
dissoute dans 500 ml de PBS
- . Tween 20 : SERVA
- . 2e anticorps : marqué à la peroxydase, selon le dosage à
effectuer
- . Tampon pH 6 : 500 ml de solution acétate ajustés à pH 6
avec l'acide acétique (Coviv)
 - solution acétate de sodium 3H₂O : 9,5 g/500 ml
 - solution d'acide acétique : 5,25 g/250 ml
- . Tampon pH 9,6 : Peser 1,06 g de Na₂CO₃ qsp 100 ml H₂O
0,84 g de NaHCO₃ qsp 100 ml H₂O
Ajuster le pH à 9,6 avec la solution bicarbo-
nate
- . Solution H₂SO₄ 9 N : 24,2 ml H₂SO₄ concentrés qsp 100 ml H₂O
- . Substrat TMB : MERCK - tétra méthyl benzidine
solution mère - 100 mg de TMB dans 10 ml de
DMSO (conservation 15 j à 4°C)
- . Solution extemporanée pour 1 plaque.
Ajouter en agitant 100 µl de solution mère à 10 ml de tampon
pH 6. Ajouter 4 µl H₂O₂ 110 volumes.

ANNEXE 5. TAMPONS DE KREBS - HENSELEIT

Solution mère :

Composant	%
1. NaCl	9
2. KCl	1,15
3. CaCl ₂	1,22
4. KH ₂ PO ₄	2,11
5. MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,82
6. NaHCO ₃	1,30 (Gazer 30 min avec CO ₂)

SOLUTION DE TRAVAIL :

Solution	ml
1	100
2	4
3	3
4	1
5	1

SOLUTION DE KREBS - HENSELEIT COMPLEMENTEE :

- Solution de KREBS - HENSELEIT
- Glucose : 1806,6 mg/L
- Glutamine : 146,15 mg/L

ANNEXE 6. FORMULAIRES DE SOLUTIONS HISTOLOGIQUES (MARTOJA et MARTOJA, 1967)

1. Bouin-Hollande-sublimé :

- eau distillée	100 ml
- acétate de cuivre	2,5 ml
- Formol	10 ml
- Solution aqueuse saturée de chlorure mercurique	1 ml
- acide picrique	environ 4 g

2. Eau albumineuse :

- albumine glycerinée	1 vol
- eau distillée	20 vol

3. Trichrome de Masson :

- Hématoxyline de Groat :

1. acide sulfurique concentré	0,8 ml
alun de fer	1 g
eau distillée	50 ml
2. hématoxyline	0,5 g
alcool à 95°	50 ml

Après dissolution, mélanger les 2 solutions, laisser reposer pendant 1 H et filtrer; se conserver pendant 3 mois.

- Fuchsine-ponceau : (préparation à froid)

Fuchsine acide	0,1 g
ponceau	0,2 g
eau distillée	300 ml

Après dissolution, ajouter :

acide acétique	0,6 ml
----------------	--------

- Orangé G-molybdique : (préparation à froid)

orange G	2 g
eau distillée	100 ml
acide phosphomolybdique	3 à 5 g

- Vert lumière :

vert lumière	0,2 g
eau distillée	100 ml

- Solution aqueuse à 1% d'acide acétique

Mode opératoire :

1. Déparaffiner, hydrater
2. Colorer par l'hématoxyline, 2 à 5 min
3. Laver à l'eau courante pendant 5 min
4. Colorer par le Fuchsine-ponceau, 5 min
5. Rincer à l'eau acétique
6. Colorer par l'orangé G-molybdique, 5 min
7. Rincer à l'eau acétique
8. Colorer par le vert lumière, 5 min
9. Laver à l'eau acétique
10. Déshydrater, monter



Ces travaux feront l'objet des publications suivantes :

1. Allergenicity of bovine casein. 1. Specific lymphocyte proliferation and histamine accumulation in the mastocyte as a result of casein feeding in mice (soumis pour publication dans International Archives of Allergy and Applied Immunology)
2. Allergenicity of bovine casein. 2. Casein and its digestive-enzyme-hydrolysates induce in vitro lymphocyte responses in casein fed mice (manuscript en preparation)
3. Allergenicity of bovine casein. 3. In vitro mouse intestinale absorption of casein derived antigenic fragments (manuscript en preparation)

RESUME

L'ingestion de caséines par des souris à raison de 100 mg/jour entraîne une réponse lymphoblastique *in vitro* en présence de cet antigène et une production d'IgG totale dans le plasma ainsi que dans le surnageant de culture de lymphocytes. Cette sensibilisation est mise en évidence par le test de transformation lymphoblastique (TTL) où la présence de caséines dans le milieu de culture augmente l'incorporation de ³H-Thymidine dans les lymphocytes. L'introduction de l'antigène sensibilise les souris d'autant plus vite et plus fort qu'elles sont plus jeunes.

Les lymphocytes sensibilisés par l'ingestion de la caséine, reconnaissent non seulement les caséines mais aussi leurs fragments obtenus par l'hydrolyse de pepsine (P) et de pepsine-trypsine-chymotrypsine (PTC). Cela signifie que les processus d'hydrolyse par les enzymes digestives n'éliminent pas les déterminants antigéniques de la caséine.

La production d'IgG totales dans le plasma ainsi que dans les surnageants de culture de lymphocytes n'est pas parallèle à la production d'IgG spécifiques anticaséines. De plus, il n'existe pas d'indication de la production d'IgE par les souris car les résultats du test de la libération antigénique de l'histamine des mastocytes (TLAHM) et du test cutané ne se révèlent pas positifs. Cependant, la sensibilisation de lymphocytes et l'accumulation d'histamine dans les mastocytes après apport en caséines sont des éléments importants qui permettent de penser qu'un déclenchement de la réaction allergique serait possible.

Les résultats des expériences d'absorption intestinale en utilisant les sacs intestinaux retournés de souris montrent des passages des antigènes issus des caséines et des hydrolysats P et PTC. L'analyse ultérieure par électrophorèse et autoradiographie ne montre que l'absorption des fragments dérivés de l'hydrolysats P. Ces fragments ont des poids moléculaires d'environ 2500 Da. Cependant l'identification par la méthode d'ultrafiltration montre l'absorption de fragments issus de ces trois produits de poids moléculaires inférieurs à 3000 Da. Ces fragments ainsi absorbés contiennent toujours des sites antigéniques (déterminés par les méthodes d'immunodotting et de radioimmunodotting).

La détermination de l'antigénicité des caséines natives et de leurs hydrolysats P et PTC est réalisée par des méthodes ELISA et immunodotting en utilisant les immunosérums anti caséines α , β et κ . Cette capacité est retrouvée dans toutes les fractions CLHP testées sauf pour les fractions provenant de l'hydrolysats PTC. Ces dernières ne forment pas de complexe antigène-anticorps avec les immunosérums anti caséine κ .

L'ensemble des résultats trouvés dans ces études établie les étapes de la sensibilisation par les caséines qu'on peut résumer comme suit : Consommation des caséines (antigènes)---> Hydrolyse enzymatique dans le tube digestif---> Absorption des peptides antigéniques (P.M. <3000 Da) --->sensibilisation des lymphocytes---> Production d'IgG