

Liste des abréviations

APLV	: Allergie aux protéines du lait de vache.
SAB	: Sérum albumine bovine.
α-La	: α -lactalbumine.
β-Lg	: β -lactoglobuline.
eHF	: Formule extensivement hydrolysée.
HeR	: Hydrolysats extensifs de protéines de riz.
HPR	: Hydrolysats de protéines de riz.
SDS	: Dodécyl sulfate de sodium.
Temed	: TetraMethylEthyleneDiamine
PM	: Poids Moléculaire.
pH	: Potentiel d'hydrogène.
PLV	: Protéines de lait de vache.
KDa	: Kilo Dalton.
M	: Molaire.
mM	: Milli molaire.
H	: Heure.
IMC	: Indice de masse corporelle.
DRACMA	: Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy.
PPN	: Préparation pour nourrissons.
PP	: Plaques de Peyer.
ESPACI	: European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology.
ESPGHA	: European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.
HA	: Hypo Allergénique.
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay.
AGPI-LC	: Acides Gras Polyinsaturés à Longues Chaînes.
AGE	: Acide gras essentiel.
IgE	: Immunoglobuline E.
IgG	: Immunoglobuline G.
OPD	: Ortho-phénylène-diamine.

CE : Cellules épithéliales.
LIE : Lymphocytes intra épithéliaux.
C : Cryptes.
V : Villosités.
GALT : Gut associated lymphoid tissu.
GINI : German infant nutritional intervention study.
DDP : Différence de potentiel.
Isc : Intensity of short circuit.
G : Conductance.
μA : micro Ampère.
Al(OH) : Hydroxide d'aluminium.
HPR : Hydrolysats de protéines de riz.

Liste des Figures

Figure 1: Organisation spéciale schématique des tissus lymphoïdes associés à la paroi digestive.....	16
Figure 2: La prise en charge des antigènes alimentaires présent dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.....	17
Figure 3: Vue schématique de la muqueuse intestinale montrant les villosités et les cryptes.....	19
Figure 4: Biopsies intestinales permettant d'évoquer le diagnostic histologique	20
Figure 5: Schéma de répartition des souris par différents groupes expérimentaux.....	32
Figure 6: Teneur en protéines du lait de vache et l'hydrolysate à base de protéines de riz (Modilac Expert Riz®).....	49
Figure 7: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS des protéines du lait de vache et de la préparation à base de protéines de riz hydrolysées.....	50
Figure 8: Croissance pondérale des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	52
Figure 9: Croissance pondérale des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	53
Figure 10: Croissance pondérale des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	54
Figure 11: Croissance pondérale des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	55
Figure 12: Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours d'expérimentation des souris immunisées à la β -Lg.....	56
Figure 13: Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours d'expérimentation des souris immunisées à l' α -La.....	57
Figure 14: Titre en IgG sériques spécifiques mesurés par la méthode ELISA à J ₀ , J ₃₅ et à J ₆₃ , chez des souris Balb/c immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz.....	59
Figure 15: Titre en IgG sériques spécifiques mesurés par la méthode ELISA à J ₀ , à J ₃₅ et à J ₆₃ ,chez des souris Balb/c immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz.....	60

Figure 16: Titre en IgE sériques spécifiques mesurées par la méthode ELISA à J0 et à J35, chez des souris Balb/c immunisées à la β -Lg.....	61
Figure 17: Titre en IgE sériques spécifiques mesurées par la méthode ELISA à J0 et à J35, chez des souris Balb/c immunisées à la α -La.....	62
Figure 18: Réactivité de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées avec les IgG anti β -Lg bovine.....	63
Figure 19: Réactivité de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées avec les IgG anti α -La.....	64
Figure 20: Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalun-éosine des souris témoins négatifs.....	67
Figure 21: Observations microscopiques des fragments de jéjunum au microscope optique G (10x10) et G (10x40) colorés à l'hémalun-éosine des souris témoins positifs immunisées à la β -Lg.....	68
Figure 22: Observation microscopique G (10x40) d'un fragment de jéjunum coloré à l'hémalun-éosine d'une souris témoin positif immunisée à l' α -La.....	69
Figure 23: Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalun-éosine des souris immunisées à la β -Lg, nourries ensuite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	70
Figure 24: Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalun-éosine des souris immunisées à l' α -La nourries ensuite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.....	71
Figure 25: Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéine de riz pendant 28 jours, comparée à celle des souris témoins négatifs et positifs.....	72
Figure 26: Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours, comparée à celle des souris témoins négatifs et positifs.....	73
Figure 27: Effet du régime à base de protéines de riz sur le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des villosités intestinales des fragments jéjunaux des souris immunisées à la β -Lg comparé aux témoins négatifs et positifs.....	74

Figure 28: Effet du régime à base de protéine de riz sur le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des villosités intestinales de fragments jéjunaux des souris immunisées à l' α -La comparé aux témoins négatifs et positifs.....	75
Figure 29: Effet de la β -Lg sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg.....	79
Figure 30: Effet de l' α -La sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la α -La.....	80
Figure 31: Effet non spécifique de l'ovalbumine sur l'évolution du courant de court-circuit mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β -Lg et α -La.....	81
Figure 32: Effet du lait de vache sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	82
Figure 33: Effet du lait Standard sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	83
Figure 34: Effet de la formule à base de Soja sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	84
Figure 35: Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	85
Figure 36: Effet de la β -Lg sur la différence de potentiel (DDP) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg.....	89
Figure 37: Effet de l' α -La sur la différence de potentiel (DDP) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La.....	90
Figure 38: Effet du lait de vache sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	91
Figure 39: Effet du lait Standard sur la différence de potentiel (DDP) en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	92

Figure 40: Effet de la formule à base de Soja sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	93
Figure 41: Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	94
Figure 42: Effet de la β -Lg sur la conductance (G) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg.....	96
Figure 43: Effet de l' α -La sur la conductance (G) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La.....	97
Figure 44: Effet du lait de vache sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	98
Figure 45: Effet du lait Standard sur la conductance (G) en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	99
Figure 46: Effet de la formule à base de Soja sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	100
Figure 47: Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.....	101
Figure 48: Effet de l' α -La sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La préalablement incubé par le furosémide.....	105
Figure 49: Effet de la β -Lg sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement incubé par le furosémide.....	106

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des signes cliniques de l'allergie aux protéines du lait de vache.....	06
Tableau 2: Teneurs indicatives en énergie, protides, lipides, glucides et minéraux du lait de femme, du lait de vache et des préparations pour nourrissons, destinées aux nourrissons de la naissance à 4–6 mois.....	10
Tableau 3: Substituts du lait de vache pour les enfants allergiques aux PLV.....	13
Tableau 4: Composition de la formule commerciale Modilac Expert Riz [®]	23
Tableau 5: Composition des solutions utilisées pour le dosage des protéines selon la technique de Lowry.....	25
Tableau 6: Composition des gels de polyacrylamide-SDS 10 % et 16,5 %.....	26
Tableau 7: Composition du tampon d'échantillon.....	27
Tableau 8: Composition du tampon de migration.....	27
Tableau 9: Composition de la solution de coloration.....	28
Tableau 10: Composition de la solution de décoloration.....	28
Tableau 11: Composition du régime standard (tourteaux agglomérés).....	30
Tableau 12: Composition du tampon phosphate salin PBS, 1M, 10x concentré, pH=7.....	35
Tableau 13: Composition des solutions tampons ELISA.....	35
Tableau 14: Composition du colorant à l'hématoxyline de Harris.....	40
Tableau 15: Composition de la solution de Ringer, pH=7,4.....	45
Tableau 16: Classification admise pour mesurer les manifestations allergiques.....	46
Tableau 17: Effet des protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et du lait de vache ainsi que les laits infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) sur l'Isc des tissus de souris sensibilisées à la β -Lg ou l' α -La. Etude en chambre de Ussing.....	86
Tableau 18: Les valeurs de Δ Isc (courant de court circuit) des tissus sensibilisés à la β -Lg et l' α -La stimulés avec les protéines sensibilisantes β -Lg, α -La, le lait de vache, les préparations infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) ainsi que celles des témoins.....	87
Tableau 19: Effet des protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et du lait de vache ainsi que les laits infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) sur la conductance (G) des tissus de souris sensibilisées à la β -Lg ou l' α -La. Etude en chambre de Ussing.....	95

Tableau 20. Les valeurs de ΔG des tissus sensibilisés à la β -Lg et l' α -La stimulés avec les protéines sensibilisantes β -Lg, α -La, le lait de vache, les préparations infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) ainsi que celles des témoins.....102

TABLE DES MATIERES

1- Introduction	1
2- Données bibliographiques	4
2-1. L'Allergie	4
2-1.1. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV).....	4
2-1.2. Les différentes réactions aux protéines du lait de vache.....	5
2-1.3. Conséquences nutritionnelles de l'allergie aux protéines du lait de vache.....	5
2-2. Prévention et Prise en charge de l'allergie aux protéines de lait de vache	7
2-2.1. Allaitement artificiel.....	7
2-2.1.1. Préparation « HA ».....	7
2-2.1.2. Hydrolysats de protéines.....	8
2-2.1.3. Préparations à base d'acides aminés libres.....	8
2-2.2. L'allaitement maternel.....	9
2-2.3. Régime d'éviction.....	11
2-2.4. Substituts à base de végétaux.....	11
2-2.4.1. Boissons végétales.....	11
2-2.4.2. Préparations à base de protéines de soja.....	12
2-2.4.3. Hydrolysats de protéines de riz.....	12
2-3. Les protéines de riz	12
2-4. Allergènes végétaux	14
2-5. L'allergène déterminerait sa voie d'entrée au niveau de la muqueuse intestinale	14
2-6. Histologie	18
2-6.1. L'atrophie villositaire.....	18
2-6.2. Augmentation du nombre de lymphocytes intra épithéliaux.....	18
3- Matériels et méthodes	22
3-1. Produits et Réactifs	22
3-2. Échantillons utilisés	22
3-2.1. Le lait de vache.....	22
3-2.2. La Formule lactée utilisée.....	22
3-3. Caractérisation biochimique de la formule lactée	22
3-3.1. Dosage de protéines totales.....	22

3-3.1.1. Principe.....	22
3-3.1.2. Mode opératoire.....	24
3-3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	24
3-3.2.1. Principe.....	24
3-3.2.2. Mode opératoire.....	24
3-4. Etude de l'antigénicité de la formule à base de riz hydrolysé.....	29
3-4.1. Animaux.....	29
3-4.2. Adjuvant.....	29
3-4.3. Immunisation du modèle animal.....	29
3-4.3.1. Répartition des animaux.....	29
3-4.3.2. Protocole d'immunisation.....	31
3-4.4. Administration de la formule a base de riz hydrolysé.....	31
3-4.4.1. Évaluation de la consommation journalière.....	31
3-4.4.2. Mesure de la croissance pondérale.....	31
3-4.5. Prélèvement sanguin.....	33
3-4.6. Dosage des anticorps sériques.....	33
3-4.6.1. Principe.....	33
3-4.6.2. Mode opératoire.....	33
3-4.6.3. Etude de la réactivité.....	36
3-5. Etude histologique.....	36
3-5.1. Traitement des échantillons.....	36
3-5.1.1. Fixation.....	36
3-5.1.2. Déshydratation.....	37
3-5.1.3. Clarification.....	37
3-5.1.4. Inclusion.....	37
3-5.2. Traitement des lames.....	38
3-5.2.1. Etalement sur lames.....	38
3-5.2.2. Déparaffinage.....	38
3-5.2.3. Réhydratation.....	38
3-5.2.4 Coloration.....	39
3-5.3. Mesure des villosités intestinales et comptages des L.I.E.....	41

3-5.3.1. Mesure des villosités intestinales.....	41
3-5.3.2. Comptage des lymphocytes intra épithéliaux (L.I.E)	41
3-6. Test de provocation ex vivo en chambre de Ussing.....	42
3-6.1. Les formules infantiles utilisées.....	42
3-6.1.1. Produit 1.....	42
3-6.1.2. Produit 2.....	42
3-6.1.3. Produit 3.....	42
3-6.2. Mesure de l'allergenicité des différents échantillons.....	42
3-6.2.1. Principe de la chambre de Ussing.....	42
3-6.2.2. Montage de fragments de jéjunum de souris en chambre de Ussing.....	43
3-6.3. Signes cliniques: test de provocation in vivo par voie intrapéritonéale.....	44
3-7. Analyse statistique.....	44
4. Résultats.....	48
4-1. Caractérisation biochimique des échantillons.....	48
4-1.1. Dosage des protéines totales.....	48
4-1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	48
4-2. Effet de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées sur la croissance pondérale.....	51
4-3. Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz chez les souris.....	51
4-4. Etude de l'antigénicité (titres sériques en anticorps anti β-Lg et anti α-La des souris Balb/c immunisées à la β-Lg et à l'α-La)	51
4-4.1. Titres sériques en IgG.....	58
4-4.2. Titres sériques en IgE.....	58
4-4.3. Etudes de la réactivité immunologique.....	58
4-4.3.1. Mesure de la réactivité de l'hydrolysate de protéines de riz.....	58
4-5. Etude histologique.....	65
4-5.1. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs.....	65
4-5.2. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins positifs.....	65
4-5.3. Histologie de la muqueuse intestinale des souris ayant suivis un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz.....	65
4-6. Evaluation de la hauteur villositaire intestinale des souris ayant suivis un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz.....	66

4-7. Comptage des lymphocytes intra-épithéliaux (L.I.E)	66
4-8. Test de provocation in vitro en chambre Ussing Etude in vitro de l'interaction des protéines sensibilisantes, du lait de vache, lait infantile standard, formule infantile à base de soja et formule infantile à base de riz hydrolysé avec les muqueuses de souris sensibilisées à la β-Lg et α-La	76
4-8.1. Effet sur l'Isc.....	76
4-8.1.1. Effet de la β -Lg et α -La sur le courant de court circuit tissulaire l'Isc.....	76
4-8.1.2. Effet de l'ovalbumine sur l'Isc.....	77
4-8.1.3. Effet du lait de vache sur le courant de court circuit.....	77
4-8.1.4. Effet des préparations infantiles (Standard, Soja, Riz hydrolysé) sur l'Isc.....	77
4-8.1.5. L'augmentation du courant de court circuit (Δ Isc)	78
4-8.2. Effet sur la DDP.....	78
4-8.3. Effet sur la conductance.....	78
4-8.3.1. Effet de la β -Lg et l' α -La sur la conductance (G)	78
4-8.3.2. Effet du lait de vache sur la conductance (G)	88
4-8.3.3. Effet des préparations infantiles (Standard, Soja, Riz hydrolysé) sur la conductance.....	88
4-8.4. Effet du furosémide	103
4-8.5. Effet du glucose.....	103
4-8.6. Tests de provocation par voie intrapéritonéale à la β -Lg et α -La: signes cliniques..	104
5- Discussion	108
Conclusion	122
Références bibliographiques	125
Annexe	147

INTRODUCTION

1- Introduction

L'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) touche 2 à 3 % des enfants dans la population générale (Fiocchi et al., 2010). Une prévalence de 3,5 % est enregistrée dans l'est Algérien (Constantine, Annaba et Oum El Bouaghi) (Boughellout et Zidoune, 2012).

L'APLV comme toute allergie, il s'agit d'une réaction exagérée et inadaptée du système immunitaire face à des protéines qu'il considère à tort comme dangereuses. Ici, il s'agit des protéines du lait de vache que l'on peut retrouver dans le lait premier âge, mais aussi dans le lait maternel lorsque la maman qui allaite consomme des laitages (Dupont, 2008).

La prévention comme la recherche d'un traitement, constituent des sujets d'actualité. Les formules hypoallergéniques «HA» sont contre-indiquées comme l'utilisation de lait d'autres espèces animales (chèvre, brebis, jument, ânesse, chamelle) du fait d'une même composition protéique de base et d'une forte homologie de structure entre les protéines entrant dans leur composition (Sicherer, 2001). L'utilisation de préparations à base de protéines de soja étant déconseillée en raison de leur teneur en phytoestrogènes (Agostini et al., 2006).

L'allergie aux hydrolysats de protéines semble correspondre à une forme sévère d'allergie aux protéines du lait de vache (Petrus et al., 2006), elle n'est pas exceptionnelle puisqu'elle pourrait toucher 10 % des enfants allergiques au lait de vache (De Boissieu et Dupont, 2007). La définition d'un hydrolysat extensif est d'être toléré par 95 % des allergiques. Il est donc compréhensible que certains nourrissons ne tolèrent pas ces hydrolysats (Pramil et Rance, 2011) et ces produits ne sont pas totalement dépourvus d'allergénicité (Siala et al., 2013).

Le traitement est donc diététique (Dupont et al., 2011) et consiste à éliminer les protéines du lait de vache de l'alimentation de l'enfant ou de celle de la mère (Rance, 2005).

Ces dernières années une nouvelle alternative utile dans les cas d'APLV à base d'hydrolysats extensifs de protéines de riz (HeR) a été commercialisée (Fiocchi et al., 2006), d'abord en Espagne, disponible en France (Reche et al., 2010) et récemment en Algérie.

Des préparations à base de protéines de riz hydrolysées ont été développées avec une composition conforme à la réglementation européenne des aliments diététiques à des fins

médicale et permettent de couvrir les besoins nutritionnels des nourrissons, en plus la qualité gustative des préparations à base de protéines de riz est supérieure à celle des autres hydrolysats (Girardet et al., 2010). Le riz est en effet une céréale peu allergisante et naturellement dépourvue de phyto-estrogènes (Koo et Lasekan, 2007) et bien adaptée à ces indications, sous réserve de compléter sa fraction protéique en lysine, thréonine et tryptophane, pour obtenir un aminogramme conforme à celui du lait maternel qui constitue la protéine de référence (Girardet et al., 2013).

Des études ont montré la bonne tolérance de ces hydrolysats en cas d'APLV (Dupont et al., 2011). Les recommandations du DRACMA (Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy) restent prudentes sur l'utilisation des formules hydrolysées de riz pour les réserver en alternative aux hydrolysats de PLV, dans certaines situations mais certainement pas en alternative aux acides aminés de synthèse. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer ces formules (Fiocchi et al., 2010).

Actuellement, la potentialité d'un produit à prévenir l'allergie ne peut être déterminée, selon l'Espghan (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) et l'Espaci (European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology) que par des études cliniques randomisées ayant une méthodologie correcte, c'est la raison pour laquelle ce travail a été entrepris, afin d'étudier une préparation infantile commerciale à base d'hydrolysats de riz (Modilac Expert Riz[®]) utilisée dans le traitement de l'allergie aux PLV.

Notre travail a pour but d'étudier les caractéristiques biochimiques de cette formule infantile. Déterminer leur antigénicité par une méthode immunoenzymatique, à l'aide d'un modèle animal (souris Balb/c) rendu allergique aux protéines du lait de vache (α -Lac, β -Lg). Déterminer l'effet de cette formule sur l'aspect histologique de l'intestin des souris Balb/c immunisés à la (β -Lg, α -Lac) nourries avec cet hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours. Cette étude a pour but de vérifier s'il existe des modifications au niveau de la structure histologique de l'épithélium intestinal, particulièrement au niveau de l'architecture villositaire jéjunale ainsi que sur la composition en lymphocytes intra-épithéliaux.

Données Bibliographiques

2- Données bibliographiques

2-1. L'Allergie

Le terme « allergie » désigne une réaction anormale, excessive de l'organisme à un agent (allergène) auquel il est particulièrement sensible (Dutau, 2006). L'allergique est donc un individu sensibilisé qui présente des symptômes dont il se plaint ou que le médecin découvre. Ainsi, le terme « sensibilisation » désigne un état biologique (avec ou sans symptôme clinique) et « allergie » un évènement clinique pour lequel le patient va généralement consulter (Dutau et Rancé, 2009).

2-1.1. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)

L'APLV est la première allergie à apparaître chez l'enfant recevant une alimentation à base de PLV (Denisa et al., 2012). Sa prévalence diminue avec l'âge et elle est souvent associée à d'autres allergies alimentaires (Host, 2002).

Il s'agit d'une réaction reproductible liée à une ou plusieurs PLV et faisant appel à un mécanisme immunologique impliquant ou non les IgE (Dumond et al., 2006) et parfois des anticorps et des cellules à la fois. Les protéines du lait de vache expriment plusieurs types de déterminants allergéniques (épitopes), dont les uns sont conformationnels (liés à la structure tertiaire des molécules) et les autres séquentiels (liés à la séquence des acides aminés constituant les protéines). Les premiers sont majoritairement reconnus par les IgE spécifiques des enfants guérissant de leur allergie aux protéines du lait, alors que les IgE spécifiques des enfants atteints d'allergie persistante reconnaissent à la fois les épitopes conformationnels et séquentiels (Nowak-Wegrzyn et al., 2008).

Si l'évolution est généralement favorable dans les APLV non IgE médiées, les APLV IgE médiées exposent à un risque accru de manifestations aiguës et de survenue de formes persistantes rendant leur prise en charge plus difficile (Siala et al., 2013).

La tolérance immunitaire survient généralement au cours de la 2^e année de vie, taux de guérison allant de 45-50% à un an, 60-75% à 2 ans, à 85-90% à 3 ans (Host et al., 2002).

Le lait de vache contient 30 à 35 g/L de protéines dont environ 80 % de caséines et 20 % de protéines du lactosérum (β -lactoglobuline, α -lactalbumine, séralbumine bovine. . .) (Paupé et al., 2001). Les caséines et la β -lactoglobuline sont le plus souvent incriminées dans l'APLV, mais toutes les protéines du lait sont potentiellement allergisantes pour l'homme (Rance et Dutau, 2009). La plupart des personnes allergiques sont d'ailleurs sensibilisées à plusieurs d'entre elles. La présence d'une allergie à la caséine d'après Boyano (2009), est un facteur de discrimination entre allergie persistante ou transitoire.

La caséine semble donc être le marqueur le plus intéressant dans le suivi et le pronostic des allergies alimentaires au lait de vache (Chabbert-Broué et Juchet, 2012).

L'un des principaux facteurs de risque de l'APLV est l'atopie maternelle. On identifie 4 types d'allergies (Fiocchi et al., 2010) :

- _ Type I : réaction immédiate, liée aux IgE.
- _ Type II : réaction cytotoxique.
- _ Type III : réaction semi-retardée (intervention de complexes immuns circulants).
- _ Type IV : réaction retardée (immunité à médiation cellulaire).

2-1.2. Les différentes réactions aux protéines du lait de vache

Les manifestations cliniques de l'APLV sont résumées dans le (tableau 1) qui représente la version courte du DRACMA (Fiocchi, 2010).

2-1.3. Conséquences nutritionnelles de l'allergie aux protéines du lait de vache

L'APLV est responsable d'une variété de symptômes considérables, impliquant la peau, le tractus digestif et rarement le tractus respiratoire (De Boissieu, 2006). La symptomatologie clinique de l'APLV est polymorphe. Son retentissement nutritionnel, variable dans son expression et son intensité, doit être systématiquement évalué. Il dépend de l'importance de l'inflammation de la muqueuse intestinale, pouvant induire une malabsorption ou une entéropathie exsudative, et parfois de pertes cutanées, en cas de dermatite atopique (Dupond et al., 2011). Les données publiées ne permettent pas de distinguer ce qui est lié à l'inflammation muqueuse et à ses conséquences, à la diminution des ingesta ou aux vomissements. La carence en fer, carence nutritionnelle la plus fréquente au cours de l'APLV. Une anémie ferriprive peut à elle seule révéler une APLV (Savilahti, 2000). Dans une étude italienne, un quart des sujets carencés en fer avaient une APLV (Ferrara et al., 2006). Certaines formes d'APLV du nourrisson

Tableau 1. Classification des signes cliniques de l'allergie aux protéines du lait de vache (Fiocchi, 2010).

Réactions gastro-intestinales

Réactions respiratoires IgE-dépendantes

Réactions cutanées IgE-dépendantes

Réactions retardées

Eczéma

Syndromes gastro-intestinaux

Maladies pulmonaires

se traduisent par une hypotrophie. Les conséquences à long terme de ces carences nutritionnelles sont mal connues. Il est connu aussi que l'hypersensibilité au lait de vache peut entraîner des troubles centraux à type d'épilepsie, de troubles du comportement, d'anorexie (Aboudiab et al., 2003; Aboudiab et al., 2007).

2-2. Prévention et Prise en charge de l'allergie aux protéines de lait de vache

2-2.1. Allaitement artificiel

Les aliments pour bébés doivent être fabriqués «à partir d'ingrédients dont il a été démontré par des données scientifiques généralement admises qu'ils conviennent à l'alimentation particulière des nourrissons et enfants en bas âge». Leur composition doit respecter les textes réglementaires qui fixent en fonction de la catégorie d'aliments les limites inférieures des teneurs pour les protéines et les limites supérieures pour les glucides et les lipides (Ghisolfi et al., 2013).

Au cours des dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés pour optimiser la qualité des laits infantiles. Les innovations apportées l'ont été avec le triple objectif de se rapprocher le plus possible de la composition du lait de mère, de lutter contre les petits maux fréquents du nourrisson (régurgitations, coliques, selles molles, constipation), et d'avoir un effet préventif sur l'apparition ultérieure de certaines pathologies (Patrick et Françoise, 2011).

2-2.1.1. Préparation « HA »

En 2007, la définition de l'hypoallergénicité est fondée sur une constatation pratique : absence ou diminution de liaison des IgE spécifiques à des allergènes alimentaires modifiés. Cette hypoallergénicité peut être le produit de différentes approches : soit que l'on vise une dénaturation globale des allergènes, soit que l'on diminue la quantité d'allergènes majeurs d'un aliment, soit que l'on sélectionne une variété agronomique contenant moins d'allergènes majeurs, soit que l'on obtienne des allergènes recombinants secondairement modifiés au niveau des épitopes B par génie génétique (Moneret-Vautrin et Kanny, 2007).

Les laits hypoallergéniques (HA) sont des préparations lactées issues du lait de vache dont les protéines ont subi une hydrolyse partielle. Sur le plan nutritionnel, un lait HA est proche d'un lait premier âge : la croissance staturo-pondérale est identique. Le but théorique de ces laits HA est de réduire le risque d'allergie aux protéines du lait de vache (Von Berg et al., 2007). Ce

n'est qu'un produit de prévention et non une thérapeutique de substitution. Ils ne peuvent pas être utilisés chez les enfants présentant une allergie vraie aux protéines du lait de vache (Guénard et al., 2003). Ils sont souvent prescrits en complément du lait maternel pour empêcher la survenue ultérieure de manifestations allergiques ou parfois d'emblée, dès la naissance, en dehors de tout allaitement au sein, lorsqu'il existe un terrain allergique familial (Rancé et al., 2008). Il existe des laits HA premier et deuxième âge.

2-2.1.2. Hydrolysats de protéines

Les hydrolysats de protéines sont prescrits aux nourrissons allergiques aux protéines du lait de vache, en substitution des protéines du lait de vache et de manière à éviter les manifestations cliniques et assurer une croissance staturo-pondérale harmonieuse. Un hydrolysat extensif a un effet plus protecteur qu'une formule classique (Osborn et Sinn, 2003). La préférence va aux hydrolysats à base de caséine (Von Berg et al., 2003).

Les hydrolysats de protéines ne sont pas équivalents. Ils diffèrent par la nature protéique de l'hydrolysate, la taille des peptides, la conformation des peptides, l'acceptabilité gustative. Certains sont issus d'une hydrolyse de la caséine bovine ou des protéines solubles du lait de vache et d'autres du collagène de porc ou d'isolats de soja. Ainsi, les hydrolysats de protéines sont obtenus après traitement des protéines par combinaison de plusieurs techniques, variables selon l'hydrolysate (chaleur, ultrafiltration, clivage enzymatique). L'hydrolyse des protéines permet la dégradation des épitopes séquentiels et conformationnels. Plus l'hydrolyse est étendue, plus l'acceptabilité gustative est mauvaise (Rancé et al., 2008).

2-2.1.3. Préparations à base d'acides aminés libres

Ce sont des formules composées d'acides aminés et sont les seules tolérées chez les rares enfants allergiques, à la fois, aux protéines du lait de vache, aux hydrolysats et aux formules à base de soja (Chouraqui et al., 2008).

En cas d'allergies alimentaires multiples ou d'allergies aux différents hydrolysats, une formule élémentaire à base de 100 % d'acides aminés libres est recommandée, d'une seule préparation de ce type, Néocate1 (SHS International-Nutricia). Le bénéfice clinique est démontré (Hill et al., 2007). Néocate est proposée aux nourrissons intolérants aux hydrolysats poussés, et poursuivie

pour des raisons de sécurité pendant un an et même au delà, dans le syndrome des allergies multiples (Molkhov, 2002).

2-2.2. L'allaitement maternel

Le lait maternel reste l'aliment de choix (tableau 2) dans la mesure où la couverture des besoins nutritionnels est réalisée par une consommation suffisante d'aliments carnés, où les apports en AGE sont optimisés par la prise d'huiles végétales adéquates et où l'enfant bénéficie d'une prescription médicamenteuse de vitamine D (Agostini, 2008; EFSA, 2009).

Si le diagnostic d'APLV est fait pendant l'administration de l'un des premiers biberons de préparation pour nourrissons (PPN) chez un enfant allaité au sein, l'idéal est la poursuite de l'allaitement (Vandenplas, 2007).

De nombreuses publications concluent à l'efficacité de l'allaitement au sein dans la réduction du développement de la maladie allergique, mais d'autres études ne confirment pas l'effet d'un allaitement prolongé (Zeiger, 2003; Kramer et al., 2007). L'allaitement maternel exclusif au moins 3 mois pourrait donc protéger de l'apparition d'une dermatite atopique chez les enfants à risque d'allergie. Un allaitement partiel ne semble pas avoir le même effet protecteur. Aucun effet préventif notable de l'allaitement sur la dermatite atopique n'a été retrouvé pour les enfants non à risque d'allergie (Chouraqui et al., 2008). Le lait de femme est riche en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI-LC), qui pourrait influencer l'effet protecteur vis-à-vis de l'apparition de manifestations allergiques (Das, 2004).

Il semble que dans les travaux où sont pris en considération les premiers signes d'allergie chez les nourrissons, l'allaitement prolongé retarderait l'apparition de l'allergie (Kull et al., 2004; Kull et al., 2005). D'après (Friedman et al., 2005; Rothenbacher et al., 2005) l'allaitement exclusif au sein pendant au moins quatre mois augmente les effets protecteurs et pourrait aussi protéger de la dermatite atopique et de l'asthme.

Tableau 2. Teneurs indicatives en énergie, protides, lipides, glucides et minéraux du lait de femme, du lait de vache et des préparations pour nourrissons, destinées aux nourrissons de la naissance à 4–6 mois (Turck, 2005).

Pour 100 mL	Lait de vache	Préparations pour nourrissons	Lait de femme mature (après J4–J5)
Poudre (g)		12,6–15	
Calories (kcal)	65	66–73	67
Protides (g)	3,7	1,5–1,9	1
Caséine (%)	80	60–80a 44–50b	40
Lipides (g)	3,5	2,6–3,8	3,5
Acide linoléique (mg)	90	350–740	350
Acide α -linoléique (mg)	Traces	30–100	37
Glucides (g)	4,5	6,7–9,5	7,5
Lactose (%)	100	47–100	85
Dextrine-maltose (g)	0	1,1–2,6	0
Autres sucres	Aucun	Amidon, glucose, fructose, saccharose	Oligosaccharides
Sels minéraux (mg)	900	250–500	210
Sodium (mg)	48	16–28	16
Calcium (mg)	125	43–93	33
Calcium/Phosphore	1,25	1,2–1,9	2
Fer (mg)	0,03	0,7–1	0,05

a Préparations à protéines non modifiées.

b Préparations à protéines adaptées.

2-2.3. Régime d'éviction

Le statut nutritionnel des enfants présentant une APLV s'améliore au fur et à mesure de l'histoire de la maladie sous régime d'exclusion et substitution. Ce statut dépend de l'observance du régime et de l'adaptation des quantités bues, soulignant l'importance d'un suivi régulier. Il s'améliore encore après retour à un régime normal (Baret et al., 2013).

Le traitement de l'APLV repose sur un régime diététique adapté et strict, caractérisé par l'exclusion complète du lait de vache (Rancé et Dutau, 2009; Doan et al., 2012) et son remplacement immédiat par un substitut alimentaire aux propriétés nutritionnelles comparables (Dupont et al., 2011). Le développement des régimes thérapeutiques bouleverse la prise en charge des patients (Bidat, 2009).

D'après Dupont (2008), l'éviction puis la réintroduction progressive sous surveillance des protéines du lait de vache sont le meilleur moyen de diagnostiquer une APLV. Les travaux récents laissent à penser que ces régimes ne facilitaient pas l'acquisition de la tolérance à l'aliment en cause (Morisset et al., 2007; Lack, 2008). L'éviction prolongée des PLV lorsque les substituts sont insuffisants, peut induire diverses carences (Christie et al., 2002). Le régime doit être thérapeutique en facilitant l'acquisition de la tolérance à l'aliment (Burks et al., 2008). Le maintien de PLV dans l'alimentation à la dose tolérée faciliterait l'acquisition de la tolérance selon certaines études (Barbi et al., 2008; Allen et al., 2009).

2-2.4. Substituts à base de végétaux

2-2.4.1. Boissons végétales

Des régimes restrictifs avec éviction totale de produits animaux sont parfois imposés aux enfants dès le plus jeune âge. Des boissons à base de végétaux (amandes, châtaignes, riz, noisettes, soja. . .) improprement appelées « laits végétaux » alors que la dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale et ne concerne donc que des produits d'origine animale. Cette appellation prêtant à confusion, associée à un marketing et un packaging suggestifs, les présente comme une alternative alimentaire alors que leur composition, souvent disponible de façon incomplète ne satisfait pas à la réglementation concernant les aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (Diane et al., 2013). La composition de ces boissons végétales n'est pas adaptée aux besoins des nourrissons et enfants en bas âge et elles représentent un danger majeur (Elbez, 2006).

2-2.4.2. Préparations à base de protéines de soja

Ces préparations contiennent des quantités élevées de phyto-oestrogènes dont l'effet sur les enfants est encore mal connu (Dupont et al., 2011). Des résultats obtenus par Addou et al. (2013) indiquent que l'ingestion du lait de soja provoque une altération de la fertilité masculine chez les souris Swiss. Ainsi selon Fiocchi et al. (2010) les préparations à base de soja ne doivent pas être utilisées avant l'âge de 6 mois pour éviter des risques nutritionnels d'allergies.

Certains enfants allergiques aux protéines du lait de vache reçoivent une alimentation substitutive par du lait de soja. Toutefois, selon l'âge des enfants et selon les études, 1 à 37 % de ces enfants présentent une sensibilisation et non exceptionnellement, une allergie au lait de soja. L'un des allergènes majeurs responsables de cette réactivité croisée est la glycinine A4A5B3 (Ponvert, 2009).

2-2.4.3. Hydrolysats de protéines de riz

Un hydrolysats de protéines de riz, enrichi en lysine, tryptophane et thréonine, disponible depuis 2009, semble prometteur. Modilac Expert Riz[®] (tableau 3) formé d'hydrolysats de protéines de riz est un aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales et utilisé comme une alternative végétale en cas d'allergie aux protéines de lait de vache, de réalimentation à la suite de diarrhées aiguës, prolongées ou chroniques, de malnutrition. Les études montrent sa bonne tolérance en cas d'APLV (Reche et al., 2010). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer ces formules (Fiocchi et al., 2010).

2-3. Les protéines de riz

Les protéines de riz font partie de l'alimentation de base pour plus de la moitié de la population mondiale, ils sont importants grâce à leurs hypoallergénicité et leurs qualités gustatives, donc ils constituent une bonne alternative dans les traitements d'allergie alimentaire notamment l'APLV (Pinciroli et al., 2009), les protéines constitue 9% du poids sec d'un grain de riz formé essentiellement d'albumine, gluteline, et prolamine et comme la plupart des protéines végétales ces protéines sont déficitaire en acide aminé essentiel comme la lysine (Huifeng et al., 2010), c'est pour cette raison que les préparations à base de protéines de riz telle que Modilac Expert Riz[®] destiné à l'alimentation des enfants allergiques aux PLV sont enrichis en lysine afin d'assurer une bonne efficacité nutritionnelle.

Tableau 3. Substituts du lait de vache pour les enfants allergiques aux PLV
(Dupont et al., 2011).

Appellation		Peptijunior (Nutricia®)	Neocate (Nutricia Advanced Medical Nutrition®)	Modilac Expert Riz 1®	Modilac Expert Riz 2®
Analyse moyenne Pour 100 ml	Unités				
Présentation Boite	450g		400g	800g	800g
Hydrolysats extensifs (eHF) Ou acides aminés		eHF de protéines solubles	Acides aminés	eHF de protéines de riz supplémenté en acides aminés	eHF de protéines de riz supplémenté en acides aminés
Valeur énergétique	Kcal	67	71	68	68
Protéines	G	1,8	1,9	1,6	2
Glucides	G	6,9	7,9	7,6	8,1
Lactose	G	Sans	Sans	Sans	Sans
Malto-dextrine	G	5,7	6,4	6	6,4
Amidons	G			1,6	1,7
Type			Sirop de glucose De maïs	Maïs	Maïs
Lipides	G	3,6	3,5	3,4	3,1
Acide linoléique	Mg	740	579	444	407
Acide α -linoléique	Mg	100	57,9	38	35
Acide arachidonique	Mg	6,7	11,3	Non	
Acide docosahexaénoïque	Mg	6,7	6,4	Non	
Triglycérides à chaîne moyenne	G	1,8		0,7	0,7
Calcium	Mg	57	69	61	70
Phosphore	Mg	27,6	50	34	46
Fer	Mg	0,8	1,05	0,7	1,1
Mesurette	G	3,8	4,4	4,5	4,2
Reconstitution		12,8%	14,7%	13,5%	14%
Osmolarité mOsmol/L		188	320	200	200

2-4. Allergènes végétaux

La connaissance des allergies moléculaires des végétaux comestibles a beaucoup progressé au cours des dernières années. Les auteurs rappellent l'intérêt que présente l'identification des allergènes d'un point de vue moléculaire : lien avec des manifestations cliniques plus ou moins sévères, approche moléculaire de l'épidémiologie des sensibilisations, interprétation de multi sensibilisations. Les allergènes moléculaires des différentes familles de sources allergéniques végétales comestibles sont rappelés, avec cette distinction : (1) les familles à forte prévalence de sensibilisation : les prolamines, 2S-albumine, LTP, inhibiteurs d'alpha-amylase, les cupines (7S et 11S globulines), les profilines, les protéines B et v 1-like, et (2) les familles d'allergènes végétaux à faible prévalence de sensibilisation tels que les 1-3 β -glucanases, les 1-endochitinases, les isoflavones réductases (Pauli, 2011).

2-5. L'allergène déterminerait sa voie d'entrée au niveau de la muqueuse intestinale

Les réactions allergiques chez l'enfant sont cinq fois plus fréquentes en raison à la fois d'une maturité imparfaite du système immunitaire et d'une hyperperméabilité transitoire de la barrière intestinale à la naissance expliquant la possibilité de polysensibilisations précoce (Nancey et al., 2005). Sur le plan fondamental, l'APLV est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale aux protéines, au stade aigu de la maladie (Ayad et al., 2008).

L'intestin joue un rôle fondamental de barrière sélective de l'organisme assurant l'entrée des nutriments et empêchant la pénétration de nombreux xénobiotiques, allergènes et agents infectieux dans l'organisme (figure 1). Les principaux acteurs de cette barrière intestinale sont : le mucus associé à la couche hydrophobe qui le recouvre et les jonctions serrées qui scellent entre elles les cellules épithéliales et régulent le passage para cellulaire des molécules (Chin et al., 2000; Guarner, 2006; Torre et al., 2008; Délzenne et Cani, 2008; Pujol, 2009).

Malgré l'intégrité de la barrière intestinale, l'absorption gastro-intestinale d'allergènes entiers a été démontrée in vitro (Moreno et al., 2006; Bodinier et al., 2007) et in vivo (Chambers et al., 2004). Le point de passage de la protéine semble être un facteur très important pour la sensibilisation (Adel et al., 2008). Les jonctions serrées intercellulaires déterminent la perméabilité paracellulaire et en condition normale seules les petites molécules sont perméables

(Nové, 2008). En effet, le lieu d'entrée de la protéine et le type de réponse immunitaire induite seraient liés. Au niveau des cellules M, les particules et macromolécules sont efficacement endocytées puis transmises sans dégradation au système lymphatique sous jacent (figure 2) : une entrée via les cellules M et une présentation au niveau des plaques de Peyer (PP) favoriserait une réponse locale et systémique. À l'inverse, les antigènes solubles peuvent, soit être captés par les entérocytes, ils subissent alors majoritairement une dégradation intracellulaire lysosomiale, soit être pris en charge par les cellules dendritiques de la lamina propria, et transportés au niveau des ganglions mésentériques (Worbs et al., 2006). Ces voies favoriseraient l'induction de réponses régulatrices. De façon intéressante, il apparaît que la voie d'entrée dans l'organisme serait en partie dictée par la nature de l'antigène/l'allergène. In vitro, la β -lactoglobuline native est transportée de façon plus efficace par les cellules M que par les entérocytes, tandis que le traitement thermique diminue ce passage (Rytönen et al., 2006).

Le contenu luminal peut être reconnu grâce au transport d'immun-complexes IgE dans l'allergie, ces complexes permettent une réponse inflammatoire qui est protectrice lorsqu'il s'agit d'éradiquer des bactéries pathogènes mais délétère lorsqu'il s'agit de complexes portant des antigènes ou allergènes alimentaires (allergies, maladie cœliaque) (Martine, 2010).

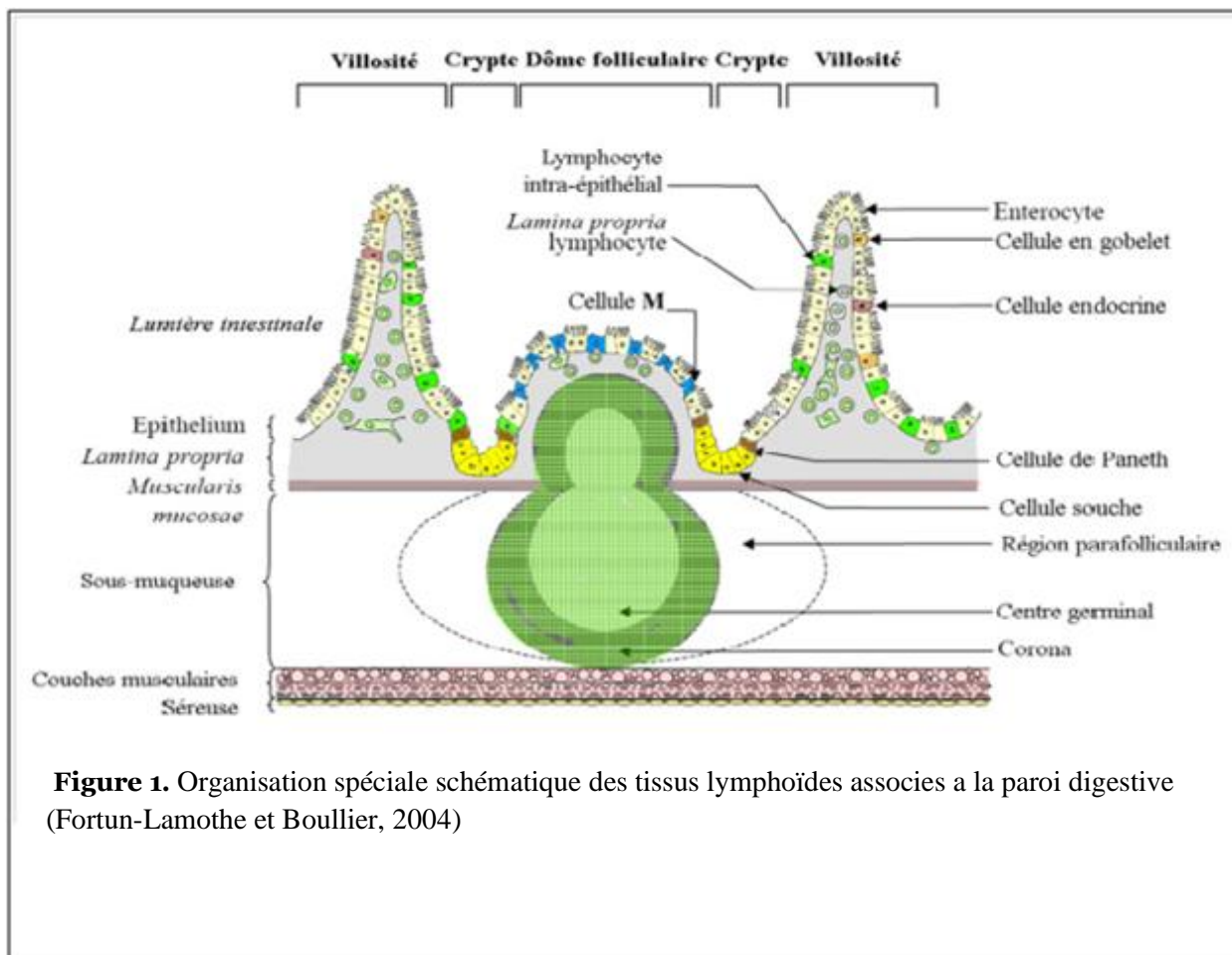


Figure 1. Organisation spéciale schématique des tissus lymphoïdes associés à la paroi digestive (Fortun-Lamothe et Boullier, 2004)



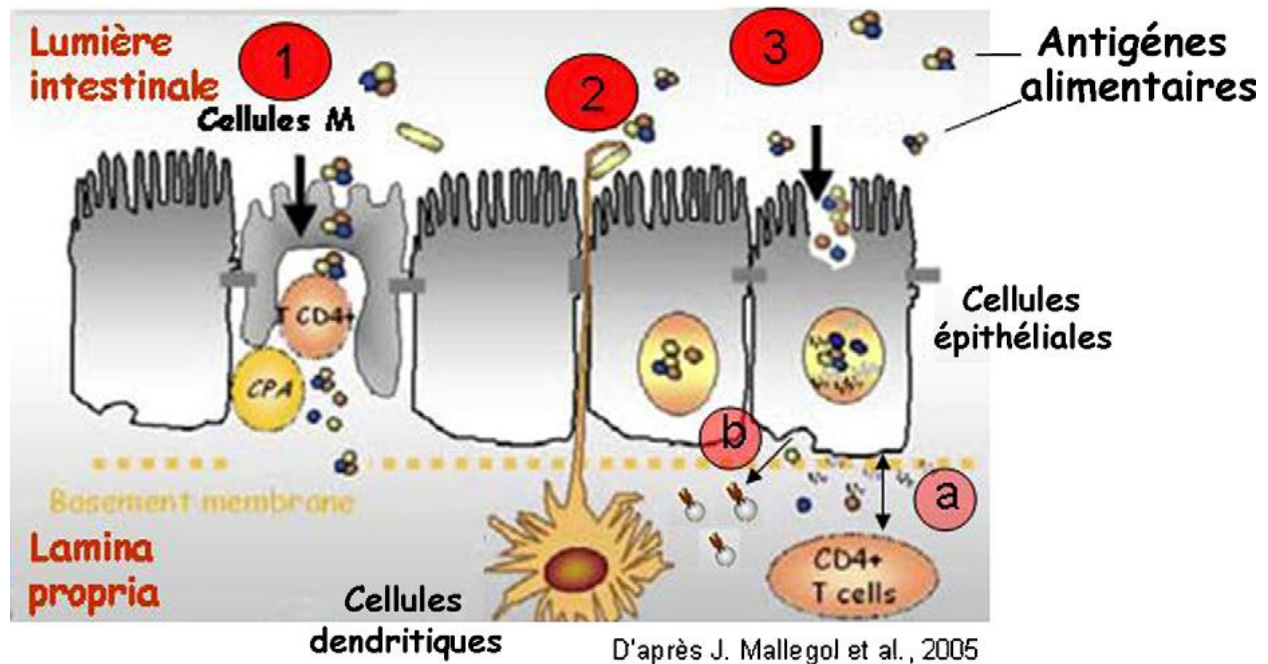


Figure 2. La prise en charge des antigènes alimentaires présent dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale.

Le passage transépithélial des antigènes présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire du GALT implique trois voies différentes : (1) la capture par les cellules M recouvrant les plaques de Peyer, (2) l'échantillonnage direct par les cellules dendritiques de la lamina propria, via des dendrites s'étendant dans la lumière intestinale, et (3) endocytose des antigènes par les cellules épithéliales puis présentation aux cellules T sous-jacentes (a) ou libération d'exosomes portant les peptides antigéniques associés au molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (b). Adapté d'après Mallegol et al., (2005).

2-6. Histologie

Les biopsies digestives peuvent montrer des lésions intestinales avec des atrophies villositaires fréquentes, toutefois d'intensité variable. Un infiltrat d'éosinophiles peut être retrouvé et est très évocateur d'un phénomène allergique à l'origine de ces lésions (De Boissieu et Dupont, 2002).

Dans le cas de manifestations d'hypersensibilités gastro-intestinales à éosinophiles, des investigations complémentaires (endoscopie et biopsies) sont indispensables pour confirmer le diagnostic de l'APLV (Rothenberg, 2004). La biopsie intestinale, demandée sur un ensemble d'arguments cliniques et biologiques, mettait en évidence les modifications caractéristiques de l'architecture de la muqueuse : hyperplasie des cryptes, atrophie villositaire avec un rapport C/V supérieur à 2; une hypercellularité franche du chorion; une augmentation nette très spécifique du nombre de lymphocytes T dans l'épithélium (Schmitz et Garnier, 2008).

2-6.1. L'atrophie villositaire

L'évaluation de l'atrophie villositaire (AV) est fondée sur la mesure de la hauteur respective des villosités (V) et des cryptes (C) (figure 3). Une hauteur villositaire normale correspond à un rapport villosités/cryptes de deux à trois (Verkarre et Brousse, 2013). L'atrophie des villosités (figure 4) est toujours associée à une hyperplasie des cryptes avec augmentation du nombre des mitoses et elle peut être plus ou moins étendue le long de l'intestin grêle et de degré variable au moment du diagnostic. La sévérité des symptômes n'est pas corrélée au degré d'atrophie (Malamut et al., 2008).

2-6.2. Augmentation du nombre de lymphocytes intra épithéliaux

Le nombre normal de lymphocytes intra épithéliaux (LIE) est inférieur à 30 pour 100 cellules épithéliales (CE) (30 %) (Patey et al., 2000), < 25 % pour Hayat et al. (2002). A l'état normal, les LIE de l'intestin représentent une population hétérogène de lymphocytes T mémoires (90 % CD45RO+) dont 20 % contiennent des granules cytotoxiques (TIA1 et granzyme B) et 60 % expriment des marqueurs natural killer comme le CD94 (Jabri et al., 2000). Il existe trois populations distinctes de LIE. Les trois-quarts des LIE sont de phénotype CD3+ CD8+ ; moins de 15 % sont CD3+ CD4-CD8-; et moins de 10% sont CD7+. Enfin, contrairement aux lymphocytes T du chorion et aux lymphocytes T circulants périphériques, les LIE CD3+ CD4+ sont minoritaires.

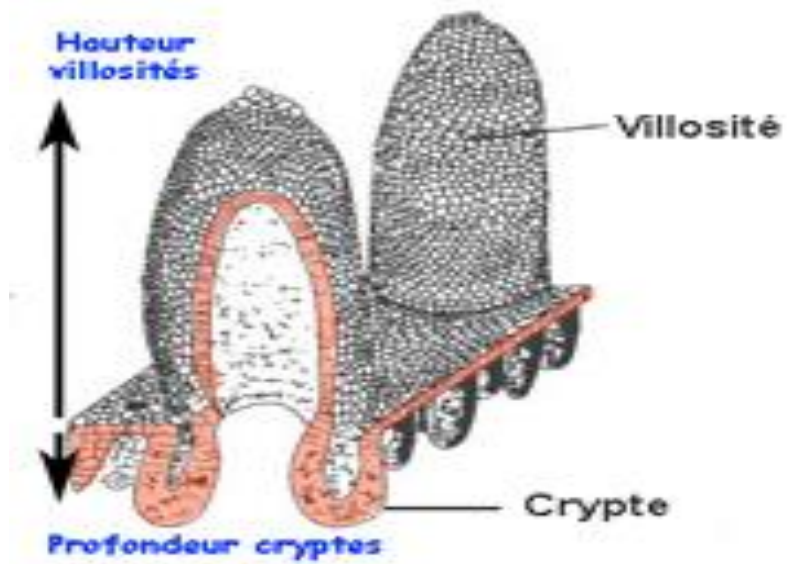


Figure 3 : Vue schématique de la muqueuse intestinale montrant les villosités et les cryptes (François, 2005).

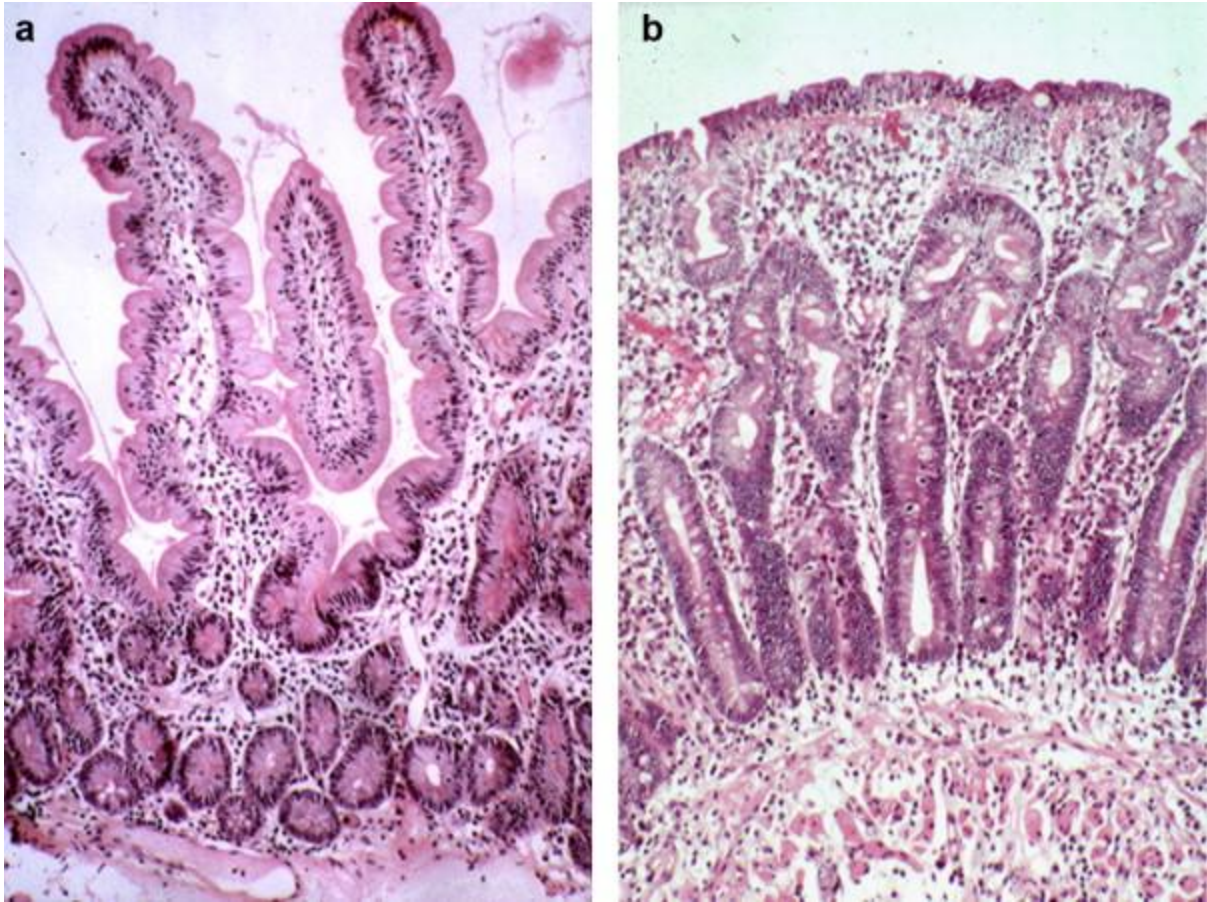


Figure 4. Biopsies intestinales permettant d'évoquer le diagnostic histologique.

a : Muqueuse intestinale normale : villosités de hauteur normale; **b:** Atrophie villositaire totale, hyperplasie des cryptes, augmentation des lymphocytes intraépithéliaux et de la cellularité du chorion (Verkarre et Brousse, 2013).

Matériels et Méthodes

3- Matériels et méthodes

3-1. Produits et Réactifs

Les différents produits et réactifs utilisés pour les dosages biochimiques proviennent de chez Prolabo, Merck et Sigma (France). Les fractions pures des protéines β -Lg, α -La, SAB et Caséines sont des produits Sigma et Merck (France).

3-2. Échantillons utilisés

3-2. 1. Le lait de vache

Le lait utilisé a été fraîchement collecté dans une ferme d'élevage bovin de la région Oranaise (Algérie), le lait cru (pH 6,8) collecté est écrémé par centrifugation à 3500 tours/mn pendant 15 minutes à 4°C. Cette opération est destinée à éliminer la matière grasse, le lait écrémé est ensuite lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de type Speed Vac concentrator 100H.

3-2. 2. La Formule infantile utilisée

La préparation utilisée Modilac Expert Riz[®] (tableau 4), est un aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales en cas d'allergie aux protéines du lait de vache, de réalimentation à la suite de diarrhées aiguës, prolongées ou chroniques de malnutrition. Il s'agit d'une préparation à base de protéines de riz hydrolysées 100% végétale sans PLV et sans lactose, ce produit fait partie de la gamme Modilac du laboratoire Sodilac spécialisé dans la conception et la fabrication des laits infantiles.

3-3. Caractérisation biochimique de la formule lactée

3-3.1. Dosage de protéines totales

3-3.1.1. Principe

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe protéine/cuivre (réaction de Biuret) et la réduction d'un réactif, le phosphomolybdate-phosphotungstate (réactif de Folin-Ciocalteu phénol) par les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en milieu alcalin (pH à peu près égal à 10) (Lowry et al., 1951). Cette réduction se traduit par une coloration bleue. Ce procédé est applicable quand la quantité des protéines à déterminer est comprise entre 20 et 200 μ g/ml.

Tableau 4 : Composition de la formule commerciale Modilac Expert Riz[®]

Analyse moyenne pour 100 ml		Modilac Expert Riz [®]
Présentation Boite		800 g
Valeur énergétique kcal		68
Protéines	g	1,6
Glucides	g	7,6
Lactose	g	Sans
Malto-dextrine	g	6
Amidons de Mais	g	1,6
Lipides	g	3,4
Acide linoléique	mg	444
Acide α-linolénique	mg	38
Acide arachidonique	mg	Non
Acide docosahexaénoïque	mg	Non
Triglycérides à chaîne moyenne	g	0,7
Calcium	mg	61
Phosphore	mg	34
Fer	mg	0,7
Mesurette	g	4,5
Reconstitution		13,5%
Osmolarité mOsmol/L		200

3-3.1.2. Mode opératoire

Le dosage de protéines est effectué sur le lait bovin et sur la préparation à base de protéines de riz hydrolysées (Modilac Expert Riz[®]). La lecture se fait au spectrophotomètre (Jasco-V530UV/VIS) à une longueur d'onde de 750 nm à l'aide d'une cuve en quartz. Les résultats sont comparés à une courbe standard préparée avec la sérum albumine bovine (tableau 5).

3-3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Cette manipulation a été faite selon la méthode de Laemmli (1970) qui utilise deux gels de composition différente, un gel de concentration et un gel de séparation.

3-3.2.1. Principe

Dans l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS), la migration est déterminée non pas par la charge électrique intrinsèque des polypeptides mais par leur poids moléculaire. Le SDS est un détergent anionique, qui dénature les liaisons non covalentes des protéines en enveloppant la structure primaire des polypeptides. De ce fait, il leur confère une charge négative proportionnelle à leur longueur dans le rapport d'environ une molécule de SDS pour deux résidus d'acides aminés. Le mercaptoéthanol est ajouté afin de réduire les liaisons disulfures. Les complexes formés par les protéines et le SDS sont soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide.

3-3.2.2. Mode opératoire

Dans le cadre de ce travail, la formule lactée ainsi que le lait bovin sont concentrés et séparés dans deux gels de concentrations différentes, un gel de concentration en acryl-bisacrylamide 10% et un gel de séparation en acryl-bisacrylamide 16.5% (tableau 6), les échantillons dénaturés dans le tampon d'échantillon (tableau 7) sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton dans des puits formés dans le bord supérieur du gel de concentration, le gel est mis dans un tampon de migration (tableau 8) ensuite sous un voltage de 80 Volt pendant 2h. Après migration le gel est démoulé et mis dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie R250 (tableau 9) pour révéler les différentes bandes représentant les différentes protéines, ensuite le gel est mis dans une solution de décoloration (tableau 10).

Tableau 5. Composition des solutions utilisées pour le dosage des protéines selon la technique de Lowry et al, (1951).

Solution A	Na_2CO_3	2% dans de la soude 0,1 N
Solution B1	CuSO_4	5%
Solution B2	Tartrate de K et de Na Anhydre	10%

Solutions à préparer extemporanément :

Solution B : 1 ml de solution B1 + 1 ml de solution B2 + 8 ml d'eau distillée.

Solution C : 1 ml de la solution B + 50 ml de la solution A.

Solution E : Réactif de Folin dilué au demi dans de l'eau distillée.

Tableau 6. Composition des gels de polyacrylamide-SDS 10 % et 16,5 %.

Solutions	Gel de Concentration 10%	Gel de Séparation 16,5%
Tris 3M SDS 0,3% pH 8,45	2,66 ml	1,24 ml
Acryl Bis Acryl 30% - 0,8%	2 ml	500µl
Glycérol	1,06 ml	/
Eau distillée	2,28 ml	3,26 ml
Dégazage sous vide pendant 5 minutes		
Persulfate d'ammonium 10%	80 µl	40 µl
Temed 5 %	8 µl	4 µl

Tableau 7. Composition du tampon d'échantillon

Tampon d'échantillon	
Tris-HCl (1M) pH 6,8	6,25 ml
B-mercaptoéthanol	5ml
Glycérol	10 ml
SDS	2,3 g
Bleu de bromophénol 0,1 %	1ml
H ₂ O qsp	100 ml

Tableau 8. Composition du tampon de migration

Tampon de migration	
Glycine	14,4 g
Tris	3,3 g
SDS	5 g
H ₂ O	1000 ml

Tableau 9. Composition de la solution de coloration

Solution de coloration	
Bleu de Coomassie R 250	0,2g
Ethanol 96%	90 ml
Acide acétique glacial	20 ml
H ₂ O distillée	90 ml

Tableau 10. Composition de la solution de décoloration

Solution de Décoloration	
Ethanol 96 %	90 ml
Acide acétique glacial	10 ml
Glycérol	10 ml
H ₂ O distillée	90 ml

3-4. Etude de l'antigénicité de la formule à base de riz hydrolysé

3-4.1. Animaux

Les animaux utilisés dans nos protocoles sont des souris de souche Balb/c, obtenues auprès de l'institut Pasteur d'Alger. Ce sont des souris femelles congéniques, élevées et acclimatées avant toute manipulation dans l'animalerie du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire dans des conditions d'hébergement conformes à la réglementation. Les expériences sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, évitant le stress et l'agitation susceptibles d'interférer avec les résultats. Les animaux sont maintenus dans des cages munies de biberons et d'une mangeoire et sont abreuvés à l'eau du robinet et nourris avec un aliment pour rongeurs (tourteaux agglomérés) (tableau 11), obtenu auprès de la SARL la production locale Bouzareah (Alger).

3-4.2. Adjuvant

Nous avons utilisé de l'hydroxyde d'aluminium $Al(OH)_3$ ou alun comme adjuvant pour sa contribution à la stimulation de la réponse Th2 (Petrovsky et Aguilar, 2004). Pour déclencher une forte réponse immunitaire, un antigène protéique doit être injecté en association avec un mélange appelé adjuvant. Ces inertes, sont des substances non immunogènes qui augmentent la réponse immunitaire non spécifique, tant humorale que cellulaire lors de leur administration simultanée avec l'antigène, en favorisant une réaction inflammatoire. Ils agissent essentiellement en transformant les antigènes solubles en matériel particulaire, ce qui favorise leur «captation» par les cellules présentatrices et leur libération plus lente par ces dernières: tout ceci aboutit à augmenter le temps de contact entre l'antigène et les cellules immunocompétentes.

3-4.3. Immunisation du modèle animal

3-4.3.1. Répartition des animaux

100 femelles Balb/c sont utilisées pour le protocole d'immunisation. Les souris sont âgées entre 6 et 8 semaines et pèsent en moyenne $19,50 \pm 0,25$ g. Pour les besoins de chaque expérience, les animaux sont répartis en 5 groupes expérimentaux (figure 5).

Tableau 11 : Composition du régime standard (tourteaux agglomérés).

Constituants analytiques	Pourcentage %
Produits bruts	23
Matière grasse brute	0,43
Cellulose brute	4
Humidité	12
Cendres brutes	5,5
Cendres insolubles dans HCL	2

➤ **Composition minérale**

Sels minéraux	mg/kg	Sels minéraux	mg/kg
Phosphore	5900	Manganèse	90
Calcium	3300	Fer	240
Sodium	1900	Cuivre	30
Potassium	6700	Zinc	83
Magnésium	2000	Iode	3

➤ **Composition vitaminique**

Vitamines	mg/kg	Vitamines	mg/kg
Vit A	7500 UI/kg	Vit PP	75
Vit D3	1500 UI/kg	Vit E	30
Vit B1	7	Vit K3	2,5
Vit B2	6,5	Acide folique	0,5
Vit B3	16,5	Choline	1600

- Groupe 1A : 20 souris femelles Balb/c immunisées avec la β -Lg native, recevant ensuite la formule à base d'hydrolysate de riz pendant 28 jours.
- Groupe 1B : 20 souris femelles Balb/c immunisées avec la β -Lg native, recevant ensuite une alimentation standard et de l'eau pendant 28 jours et représente le témoin positif.
- Groupe 2C : 20 souris femelles Balb/c immunisées avec l' α -La, recevant ensuite la formule à base d'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.
- Groupe 2D : 20 souris femelles Balb/c immunisées avec l' α -La, recevant ensuite une alimentation standard et de l'eau pendant 28 jours et représente le témoin positif.
- Groupe 3 : 20 souris femelles Balb/c ne recevant aucun traitement. Ce lot constitue le groupe témoin négatif.

3-4.3.2. Protocole d'immunisation

Les souris des groupes 1A, 1B, 2C, 2D sont immunisées par voie intra péritonéale. Chaque souris reçoit une dose de 100 μ l d'une solution de PBS pH 7,4 contenant 10 μ g de β -Lg ou α -La selon le groupe, mélangée à 2 mg d' $\text{Al}(\text{OH})_3$. Les injections intra péritonéales ont lieu à J_0 puis, sous forme de rappels et dans les mêmes conditions, aux 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jours du protocole.

3-4.4. Administration de la formule à base de riz hydrolysé

Les groupes d'animaux 1A et 2C, sensibilisés à la β -Lg ou α -La sont nourris à la formule à base de protéines de riz hydrolysées par voie orale, cette formule est administrée aux souris ad libitum pendant 28 jours.

3-4.4.1. Évaluation de la consommation journalière

La consommation journalière de cette formule est mesurée pour chaque lot. Le volume moyen consommé par chaque souris est calculé et exprimé en ml/jour/souris.

3-4.4.2. Mesure de la croissance pondérale

Le poids corporel individuel de tous les animaux est mesuré chaque semaine pendant toute la durée de l'expérimentation.

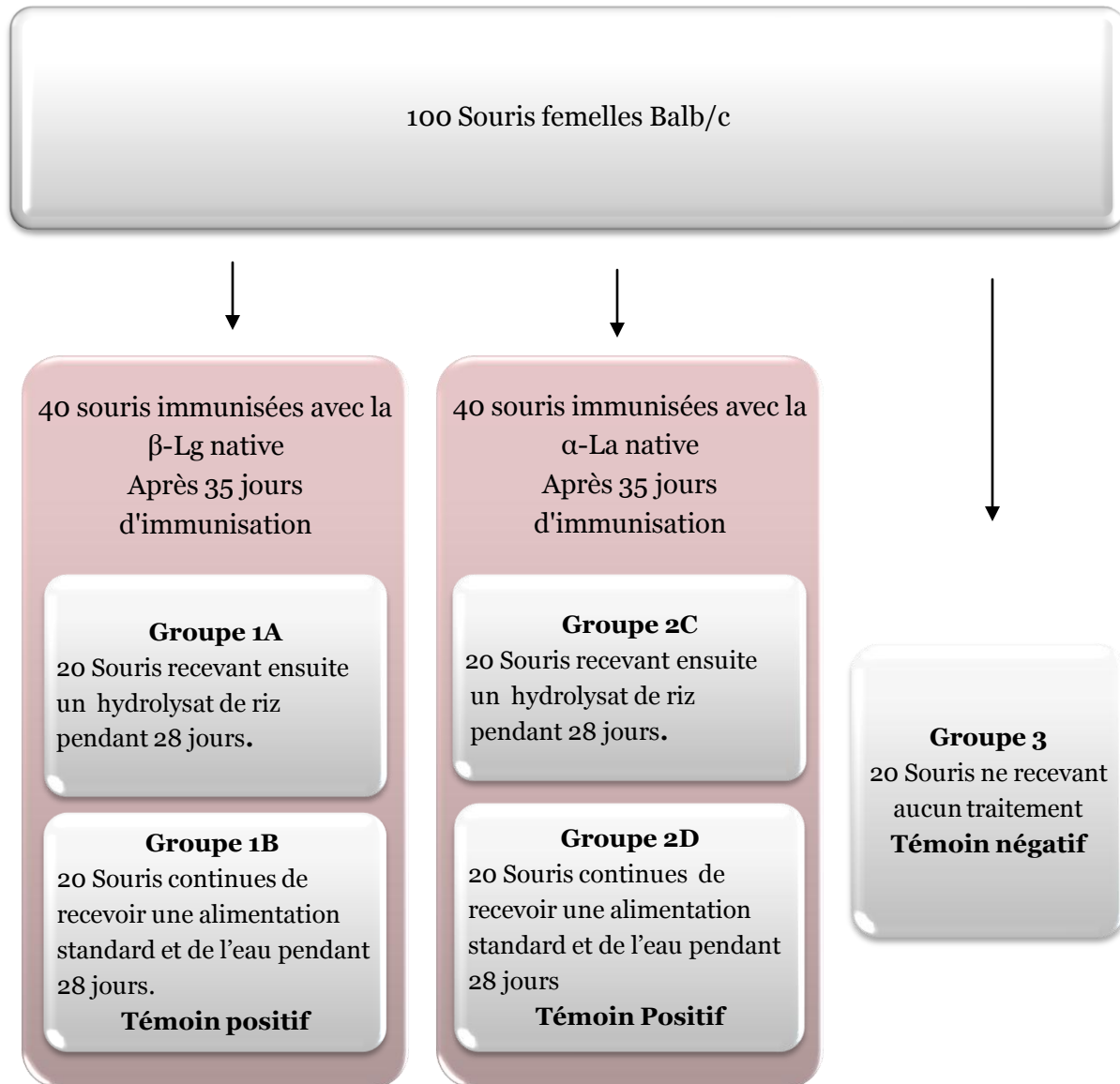


Figure 5. Schéma de répartition des souris par différents groupes expérimentaux.

3-4.5. Prélèvement sanguin

A J_0 et avant toute manipulation de l'animal, un premier prélèvement sanguin rétro-orbitaire est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur. Le deuxième prélèvement s'effectue à J_{35} , c'est-à-dire une semaine après le dernier rappel de l'immunisation et à J_{63} . Nous récoltons en moyenne un volume de 400 à 500 μl de sang par souris qui est ensuite centrifugé à 3500 tr/min pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer le sérum qui est ensuite aliquoté dans des microtubes Eppendorf que l'on conserve congelé à -20°C .

3-4.6. Dosage des anticorps sériques

Afin d'évaluer le degré de sensibilisation des souris contre la β -Lg, α -La, les anticorps sériques de différents isotypes d'immunoglobulines: IgG, et IgE totales ont été mesurés. La méthode utilisée est un procédé non compétitif par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), dont le principe est décrit ci-dessous.

3-4.6.1. Principe

Le principe de cette technique est basé sur un procédé dans lequel les anticorps à doser réagissent dans un premier temps avec l'antigène immobilisé par adsorption sur une phase solide. Dans un deuxième temps, la quantité d'anticorps fixés par l'antigène est mesurée à l'aide d'un deuxième anticorps (anti-immunoglobuline). Dans le cadre de notre travail, nous utilisons des plaques de microtitration en polystyrène (NUNC Maxisorb, puits à fond plat), qui permettent d'adsorber la plupart des antigènes. Après dépôt de l'immunosérum contenant les anticorps spécifiques, la phase solide est lavée et on révèle la présence de ces anticorps par l'addition d'un conjugué qui correspond à des anticorps couplés à une enzyme (Peroxydase). La dernière étape correspond au dosage de l'enzyme marqueur. Cette phase est essentielle, car du plus petit nombre de molécules d'enzymes que l'on pourra détecter, dépendra le seuil de sensibilité. Le substrat de la peroxydase que nous utilisons est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Au cours de la réaction enzymatique, un radical O se forme. Pour le détecter on ajoute à la solution un chromogène, l'Orthophénylène diamine (OPD).

3-4.6.2. Mode opératoire

Le dosage ELISA des IgG et IgE spécifiques anti β -Lg et α -La est réalisé par la technique ELISA (tableau 12, 13) à l'aide de plaques de 96 puits à fond plat (NUNC Maxisorb), selon les

étapes suivantes :

- Tous les puits de la microplaque reçoivent 100µl d'antigène à la concentration de 10µg/ml de β-Lg ou α-La, dilués dans du PBS pH 7,4. Les plaques sont alors incubées pendant au moins une nuit à 4°C.
- L'excès d'antigène non fixé est éliminé par 3 lavages successifs de la plaque avec du PBS-Tween 20 0,05% à l'aide d'un laveur automatique (Elx50).
- Les sites non spécifiques sont saturés par le dépôt, dans tous les puits, de 200µl par de polyvinylalcol à 2% dans du PBS pH 7,4.
- La plaque est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C puis rincée 3 fois de suite sous agitation par le tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- L'opération suivante consiste à diluer les échantillons de sérum à tester au 1/10ème dans un tampon de dilution (PBS 0,01M/ SAB 1% Tween 20 0,1% pH 7). Pour cela, une série de dilutions est alors effectuée allant de 10^{-1} à 10^{-7} . Puis un volume de 100µl est déposé dans des puits appropriés.
- La plaque est alors incubée à 37°C pendant 2 heures, puis lavée 3 fois de suite sous agitation au tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- Ensuite, chaque puits de la plaque reçoit, selon les anticorps recherchés, 100 µl d'anti anticorps de souris dilué au 1/20000ème dans du tampon de dilution. L'anti anticorps déposé est soit un anti IgG couplé à la peroxydase (Sigma) soit un anti IgE biotinylé (Pharmingen).
- La plaque est alors incubée pendant 1 heure 30 mn à 37°C, suivie d'un lavage 3 fois de suite au tampon de lavage PBS/ Tween 20 0,05%.
- 100µl d'extravidine peroxydase (Sigma) diluée au 1/5000ème dans le tampon de dilution pH 7 sont déposés dans tous les puits. La plaque est ensuite incubée pendant 30 mn à 37°C.
- Après lavage avec le PBS/Tween 20 0,05%, 200µl d'une solution contenant un chromogène (l'Orthophénylène diamine (OPD) : 8 mg dilué dans 20 ml de tampon citrate de Sodium 0,05M à pH 5,1 ainsi que 15 µl de H₂O₂) sont déposés dans chaque puits de la plaque.

Tableau 12. Composition du tampon phosphate salin PBS, 1M, 10x concentré, pH=7.

Solutions	Quantités (g)
Na ₂ HPO, 12 H ₂ O	29
KH ₂ PO ₄	2
NaCl	80
KCl	2
Thymérosal	1
Eau	1000 ml

Tableau 13. Composition des solutions tampons ELISA

Tampon à diluer au 1/10 ^{ème}	
Tampon de capture	NaHCO ₃ 0,1 M pH=9,6
Tampon de lavage	PBS 0,01 pH 7,0 Tween 20 0,05 %
Tampon de saturation	PBS 0,01 M PH=7 BSA 3%
Tampon de dilution	PBS 0,01 M pH=7 BSA 1% Tween 20 0,1 %
Solution de révélation	H ₂ O ₂ à 0,025% final, substrat de la peroxydase (Sigma) et l'OPD (Orthophénylène diamine, Sigma) à 0,5 mg/ml, révélateur de la réaction enzymatique, dilués dans un tampon citrate trisodique 0,05 M, pH 5,1.

- Une réaction colorée se développe en 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H_2SO_4 2N permet de stopper la réaction.
- L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 492 nm à l'aide d'un lecteur (ELx800).
- Des témoins positifs et négatifs ont été inclus dans chaque plaque à fin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure.

3-4.6.3. Etude de la réactivité

Dans cette partie du travail, nous mesurons l'antigénicité de la préparation infantile à base de riz, par l'étude de leur réactivité vis-à-vis des IgG spécifiques à la β -Lg et α -La (obtenus chez les souris Balb/c) en utilisant la technique immunoenzymatique Elisa précédemment décrite.

3-5. Etude histologique

Cette étude a pour but de vérifier s'il existe des modifications au niveau de la structure histologique de l'épithélium intestinal, particulièrement au niveau de l'architecture villositaire jéjunale ainsi que sur la composition en lymphocytes intra-épithéliaux des souris traitées aux hydrolysats de protéines de riz pendant 28 jours comparées aux témoins.

3-5.1. Traitement des échantillons

Les échantillons utilisés sont soumis préalablement à différentes étapes qui sont :

3-5.1.1. Fixation

Tous les fragments intestinaux sont prélevés et directement fixés dans du formol à 10%. Les solutions de formaldéhyde sont les fixateurs les plus répandus. On les utilise fréquemment à des concentrations variant de 10% à 20%. Le formaldéhyde a de nombreuses qualités : il pénètre rapidement, conserve bien les structures et n'entraîne pas de durcissement excessif ni de rétrécissement notable des tissus. Par contre, le stockage prolongé des échantillons provoque une rigidité excessive des échantillons, une faible coloration du noyau, ainsi que la formation d'un pigment brun dû à la dégradation de l'hémoglobine.

La fixation a pour but essentiel d'assurer une immobilisation des constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant. Donc la fixation doit être immédiate après le prélèvement, pour empêcher une putréfaction du tissu par autolyse (destruction tissulaire par les enzymes qu'il contient en lui-même) et par altération microbienne (putréfaction). Le volume du fixateur doit être de 20 à 50 fois celui du prélèvement. Les fragments intestinaux séjourneront de 12 à 24 heures dans le fixateur et y seront totalement immergés. Aucun fragment ne doit flotter au dessus du fixateur car la fixation ne sera ni bonne ni homogène. Ce temps est toutefois à adapter selon la consistance et la taille du tissu.

3-5.1.2. Déshydratation

Après fixation, les tissus ont été déshydratés dans 3 bains successifs d'acétone, chaque bain dure 45 minutes.

3-5.1.3. Clarification

Cette opération s'effectue après la déshydratation, les pièces sont placées dans 2 bains de xylène. Chaque bain dure 45 minutes.

3-5.1.4. Inclusion

L'inclusion a ensuite pour but d'empêcher la fragmentation des tissus et d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré. Les tissus acquièrent ainsi une consistance qui permet d'obtenir des coupes minces au microtome. La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante, insoluble dans l'eau: il n'est pas possible d'y plonger un tissu fixé, toujours très chargé d'eau: il est donc nécessaire d'effectuer au préalable une déshydratation.

L'imprégnation par la paraffine est effectuée dans un premier bain de paraffine à l'état liquide par séjour dans une étuve dont la température est réglée légèrement au dessus de son point de fusion, 56°C durant une heure. Chimiquement la paraffine est un mélange d'hydrocarbure solide saturé, à poids moléculaire élevé (parum affinis: faible affinité; cette substance est en effet caractérisée par son indifférence aux agents chimiques). Elle se présente sous forme de substance blanche, légèrement translucide, inodore, onctueuse au toucher. On imprègne les fragments d'intestins dans deux bains successifs de paraffine; le premier bain durant une heure et le deuxième bain durant deux heures.

Ces bains doivent être fréquemment changés car ils se chargent progressivement de solvant. A la sortie du dernier bain de paraffine, l'échantillon est déposé dans la paraffine fondue vierge que l'on coule dans des moules (cassettes d'inclusions); puis on laisse refroidir la paraffine. Le refroidissement de cette paraffine amène sa solidification en un bloc prêt à être coupé.

3-5.2. Traitement des lames

Le microtome permet d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 3 à 4 μm . La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant la lame du microtome. A chaque passage, celui-ci enlève une tranche d'épaisseur réglable. On peut effectuer des coupes isolées ou bien pour la reconstitution totale d'un prélèvement, réaliser des coupes sériées, disposées en forme de ruban.

3-5.2.1. Etalement sur lames

Les rubans de paraffine obtenus sont plissés et doivent être étalés sur un milieu liquide légèrement chauffé afin que les plis disparaissent et que la coupe acquière une planéité parfaite. Le collage des coupes se fait sur une lame de verre qui est recouverte d'une solution d'albumine (2 g d'albumine + 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée) qui maintient la coupe sur la lame.

Sur chaque lame de verre porte-objet est gravé le numéro d'identification du bloc. L'étalement de la coupe se fait sur une platine chauffante réglée à une température de 40°C; inférieure à celle du point de fusion de la paraffine (56°C). Les coupes égouttées et mises dans des portoirs sont ensuite séchées dans une étuve à température ambiante jusqu'au moment de la coloration. La paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation.

3-5.2.2. Déparaffinage

Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans deux bains d'un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) et ceci durant 2 minutes à chaque bain.

3-5.2.3. Réhydratation

Elle se fait dans 3 bains successifs d'alcool éthylique de degrés décroissants (100°, 95°, 90°, 70°). Chaque bain dure 2 minutes, le dernier est suivi d'un rinçage à l'eau courante.

3-5.2.4 Coloration

Après réhydratation, la coupe est colorée, le but de la coloration est de renforcer le contraste et de rendre plus évidents les différents constituants cellulaires et tissulaires ainsi que les substances extrinsèques. Les lames ont été colorées à la coloration de l'émalun-éosine, c'est la plus simple des colorations «combinées» on a fait agir successivement un colorant nucléaire «basique» l'hématéine, et un colorant cytoplasmique «acide», l'éosine. La coloration du noyau est bleu-noir et le cytoplasme rose à rouge. La préparation du colorant hématoxyline de Harris est indiquée dans le (tableau 14) (Hould, 1984).

La coloration des lames a été effectuée comme suit :

- Mettre les lames dans l' hématoxyline de Harris durant 2 à 3 minutes.
- Laver les lames à l'eau ordinaire pendant 5 minutes.
- En cas de surcoloration, les lames sont trempées légèrement dans de l'alcool chlorhydrique pendant quelques secondes (100 ml d'alcool à 95° +5 gouttes de HCl à 1%).
- Bleuir dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (rinçage).
- Laver les lames à l'eau ordinaire.
- Mettre les lames dans un bain d'alcool éthylique 1 à 2 minutes.
- Colorer les lames à l'éosine alcoolisée (2g d'éosine dans 100 ml d'alcool éthylique) pendant 5 minutes. Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage. La déshydratation est réalisée en plongeant successivement la lame dans deux bains d'alcool à 70° puis à 95° et dans un bain de solvant (toluène ou xylène) pendant 1 minute. On procède ensuite au montage des coupes qui permet la protection mécanique de la préparation, la conservation des colorations et l'obtention d'un degré de transparence et d'un indice de réfraction avantageuse d'un point de vue optique.

Après coloration une goutte de résine de montage (par exemple, Eukit ou Baume de Canada) est disposée sur la coupe, une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Lors de la manipulation, aucune bulle d'air ne doit s'insérer entre la lame et la lamelle. La résine polymérise en une vingtaine de minutes mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque d'histologie à 50°C ou simplement sur un radiateur. Après le montage, les coupes sont rangées dans des boîtes spécifiques à l'abri de la poussière.

Tableau 14. Composition du colorant à l'hémathoxyline de Harris (Hould, 1984).

Composant	Quantités
Hémathoxyline	5g
Alum de Potassium	100g
Ethanol absolu	50 ml
Eau distillée	1000 ml
Faire bouillir le mélange	
Oxyde mercurique	2,5 g
Chauffer la solution et filtrer avant usage	

3-5.3. Mesure des villosités intestinales et comptages des L.I.E

3-5.3.1. Mesure des villosités intestinales

Le relief villositaire au niveau du jéjunum est apprécié suivant différents critères, essentiellement la hauteur villositaire. La mesure de la hauteur villositaire a été effectuée sur les différents groupes expérimentaux de souris pour vérifier s'il existe une atrophie villositaire, signe de manifestation d'allergie aux protéines administrées.

Les mensurations des hauteurs sont effectuées sous un microscope optique muni d'un micromètre oculaire.

Pour déterminer le nombre de microns correspondant pour chaque objectif, nous plaçons sous le microscope un micromètre objectif qui est une sorte de lame présentant des graduations. Nous déterminons le nombre de divisions sur le micromètre objectif. Ce nombre correspond à un nombre précis de microns. Nous avons utilisés un micromètre à 200 divisions, chaque division correspond à 2 mm donc à 2000 μ m. Le micromètre oculaire comporte 100 divisions. Ces 100 divisions correspondent à 128 divisions sur le micromètre objectif pour l'objectif (x10). Puisque les 200 divisions sur le micromètre objectif correspondent à 2000 μ m, donc les 128 divisions correspondent à 1280 μ m. Pour l'objectif (x10) chaque division correspond à 12.8 μ m.

3-5.3.2. Comptage des lymphocytes intra épithéliaux (L.I.E)

Pour le comptage des lymphocytes intra-épithéliaux nous utilisons la méthode préconisée par Rouquette (1980). Pour chaque tissu, nous réalisons trois comptages, en effectuant dans un premier temps une numération de 100 entérocytes, ce qui permet d'avoir le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) pour 100 entérocytes. Le comptage des lymphocytes sur 100 entérocytes recouvre une étendue épithéliale suffisamment importante. En résumé, pour obtenir un comptage fiable des (LIE); deux conditions doivent être réunies : effectuer le comptage sur 100 entérocytes contigus, et renouveler ce comptage sur 3 champs différents et si possible sur des fragments d'intestin différents.

3-6. Test de provocation ex vivo en chambre de Ussing

3-6.1. Les formules infantiles utilisées

3-6.1.1. Produit 1

Modilac Expert Riz[®], la préparation infantile à base de riz hydrolysé précédemment décrite.

3-6.1.2. Produit 2

BIOMIL[®] SOY, est un aliment complet pour le nourrisson, élaboré à base d'isolat de protéines de soja. Ce produit est conseillé en cas d'allergie aux protéines du lait de vache ou d'intolérance au lactose.

BIOMIL[®] SOY fait parti de la gamme FASSKA S.A. qui est spécialisée dans la formulation, la production et la commercialisation de produits nutritionnels à usage humain et plus particulièrement, de laits pour nourrissons et autres aliments pour bébé. Belgique.

3-6.1.3. Produit 3

Nursie[®] lait standard. Il s'agit d'un lait industriel pour nourrisson ou préparation standard et alimentation normale. Ce lait contient des protéines de lait de vache adaptées (protéines de lactosérum et caséine). Ce produit fait parti de la gamme Blédina, marque reconnue en matière de lait infantile en France.

3-6.2. Mesure de l'allergénicité des différents échantillons

Dans cette partie du travail, et afin d'évaluer l'allergénicité des protéines des préparations infantiles, nous utilisons la technique in vitro en chambre de Ussing. Elle nous permet d'étudier l'interaction entre les différentes protéines des préparations infantiles avec l'épithélium intestinal des souris immunisées à la β -Lg, α -La.

3-6.2.1. Principe de la chambre de Ussing

La chambre de Ussing est une méthode fondamentale pour l'étude et la compréhension des mécanismes du transport intestinal. Ce dispositif expérimental a été conçu par Ussing et Zerahn en 1951 pour la mesure des flux ioniques au travers d'un épithélium. Ce protocole de mesure que nous avons adopté dans notre travail, a été utilisé par plusieurs auteurs (Saidi et al., 1995; Brahim et al., 2012).

Cette technique permet d'analyser in vitro, les paramètres électriques caractérisant un tissu, en mesurant la différence de potentiel DDP (mV), la conductance du tissu G (mmho/cm²), les variations du courant de court circuit I_{sc} (μA/cm²). Ainsi que l'étude des flux unidirectionnels et les flux nets (différences des flux unidirectionnels) d'une substance à travers l'épithélium intestinal.

3-6.2.2. Montage de fragments de jéjunum de souris en chambre de Ussing

Les souris sont maintenues à jeun depuis la veille au soir. Elles sont anesthésiées avec du chloral à 10%, puis l'abdomen est ouvert et le segment jéjunal entier est prélevé délicatement de la cavité abdominale, vidé de son contenu par deux ou trois rinçages au Ringer froid (tableau 15).

Après l'avoir délicatement débarrassé des mésentères, le segment jéjunal est ensuite incisé selon le bord mésentérique puis découpé en fragments qui sont maintenus dans du Ringer froid et oxygénés par un courant de carbogène (CO₂ : 5%, O₂ : 95%). A chaque fois, un fragment est monté entre deux chambres de lucite dont l'ouverture détermine la surface de la muqueuse intestinale exposée (0,10 cm²). Le volume de Ringer déposé dans chaque compartiment de la chambre est de 5 ml, le système est maintenu à 37°C et oxygéné par un courant de carbogène. Après montage du tissu, environ 15 à 20 minutes sont nécessaires pour stabiliser les paramètres électrophysiologiques de base. Au terme de cette période, on dépose 60μg/ml d'antigène que l'on veut tester ou 60μg/ml poudre de lait de vache ou des préparations infantiles dans le compartiment séreux de la chambre.

Les différents paramètres électrophysiologiques sont alors mesurés dans un premier temps, toutes les minutes durant les 5 premières minutes, puis 1 fois toutes les 5mn, durant 15 mn d'expérience.

Les compartiments muqueux et séreux sont reliées à une paire d'électrodes au calomel, via des ponts d'agar (4 g /100 ml de KCL 3M) aux deux faces du tissu et permettent de mesurer la différence de potentiel (PD) spontanée du tissu (séreuse positive).

Il est possible de supprimer cette PD, de l'amener à 0 mV, grâce à un système d'électrodes Ag/AgCl reliées à une source de courant permettant de passer un courant de faible intensité (10μA) à travers le tissu. Ce courant est appelé courant de court-circuit I_{sc} :

Il représente la somme des flux nets ioniques, principalement de Na⁺ et de Cl⁻ et un flux résiduel d'ions HCO₃⁻.

$$I_{sc} = J_{net}^{Na^+} + J_{net}^{Cl^-} + J_r$$

L'application de loi d'Ohm ($U=RI$) permet de déterminer la résistance du fluide (R_f) en absence du tissu ainsi que la résistance du tissu (R_T) une fois celui-ci monté dans la chambre, ou son inverse : la conductance G ($G=1/R=1/U$).

3-6.3. Signes cliniques: test de provocation in vivo par voie intrapéritonéale

Ils ont été effectués sur l'animal sensibilisé et non sensibilisé à J 35 (05 semaines après la première sensibilisation), par une injection unique, sans adjuvant, de 1 mg d'allergène par voie intrapéritonéale. La signification clinique a été évaluée par l'analyse des signes cliniques obtenus après challenge. Les signes de manifestation allergique, sont observés 10 à 15 minutes après injection intrapéritonéale de l'antigène sans adjuvant et l'intensité de la réaction est maximale entre 20 et 40 minutes (Mc Caskill et al., 1984; Poulsen et al., 1987).

La classification admise pour mesurer les manifestations allergiques est indiquée dans le tableau 16.

3-7. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard ($X \pm ES$). Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test T de Student pour les données appariées et non appariées. L'analyse statistique est menée à l'aide d'un logiciel de statistique nommé STATISTICA (5.1.2006). L'analyse de la variance est effectuée avec le test ANOVA. Le seuil de signification retenu est celui qui est habituellement considéré, soit 5%.

Tableau 15. Composition de la solution de Ringer, pH=7,4.

Na^+	140 mM	Cl^-	120 mM
K^+	5,2 mM	HCO_3	25 mM
Ca^{++}	1,2 mM	HPO_4	2,4 mM
Mg^{++}	1,2 mM	H_2PO_4	0,4 mM

Tableau 16 : Classification admise pour mesurer les manifestations allergiques (Lifrani, 2006).

Stades	Signes
0	Pas de symptômes.
1	Grattement et frottement du nez et de la tête.
2	Gonflement autour des yeux, poils hérissés, baisse de l'activité physique avec augmentation des mouvements respiratoires.
3	Cyanose autour de la bouche et de la queue, difficultés respiratoires.
4	Absence d'activité physique, convulsions.
5	Mort.

Résultats

4- Résultats

4-1. Caractérisation biochimique des échantillons

4-1.1. Dosage des protéines totales

Ce dosage est réalisé sur le lait de vache écrémé et sur la préparation infantile extensivement hydrolysée à base de protéines de riz ($n=6$) dont n est le nombre d'échantillonnage, afin de mesurer leurs concentrations en protéines totales. Les résultats du dosage sont présentés dans la (figure 6).

Les résultats obtenus montrent que la teneur en protéines du lait de vache est de $30,98 \pm 1,77$ g/l. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par la littérature qui indique une teneur de 30 à 35 g/l pour les protéines totales du lait de vache (Vilain, 2010). La teneur en protéines totales de la préparation à base de protéines de riz hydrolysée est de $13,71 \pm 0,43$ g/l.

4-1.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Cette technique est réalisée afin de déterminer les principales protéines constituant le lait de vache, et pour s'assurer que les protéines de la préparation à base de protéines de riz sont extensivement hydrolysées car le fait d'être fractionnées, elles sont assimilées par l'organisme du bébé et ne peuvent pas déclencher de réaction allergique.

Le gel réalisé est illustré dans la (figure 7), le premier puits correspond à un kit marqueur constitué d'un mélange de protéines pures, de référence (Sigma et Merck, France), contenant de la SAB (68 000 Da), les Caséines (24 000 Da), la β -Lg (18 000 Da) et de l' α -La (14 000 Da).

Le deuxième puits du gel contient du lait de vache, il montre clairement l'existence de différentes bandes protéiques comparables aux protéines de références, il s'agit par ordre de vitesse de migration : de la Caséine, la SAB, la β -Lg et l' α -La. L'analyse du dépôt de la formule à base de riz hydrolysé dans le troisième puits montre l'absence de protéines intactes. Le quatrième puits correspond à un kit marqueur constitué d'un mélange de peptides de faible poids moléculaire de référence (Sigma).

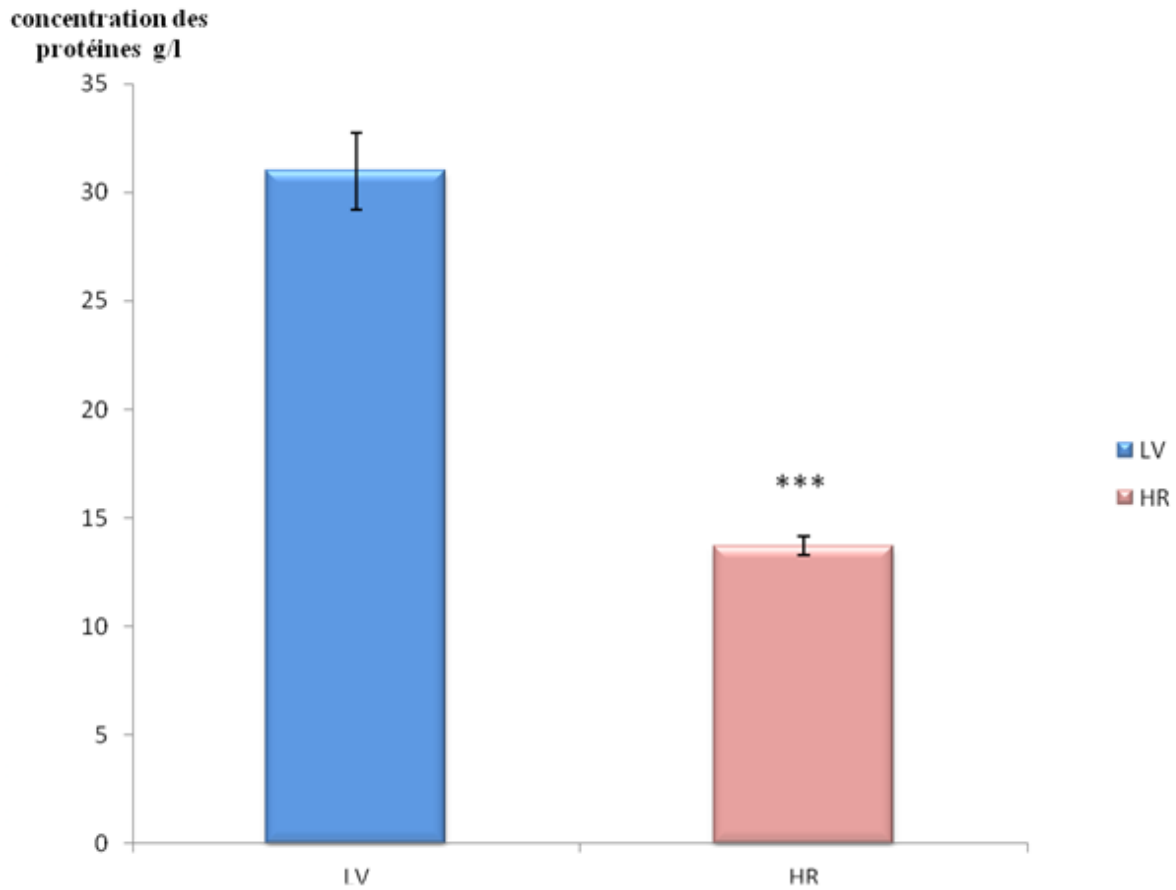


Figure 6. Teneur en protéines du lait de vache et l'hydrolysate à base de protéines de riz (Modilac Expert Riz[®]).

Les valeurs indiquées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

N= 6 dont N est le nombre d'échantillonnage.

LV : Lait de vache.

HR : Hydrolysate à base de protéines de riz.

***p < 0,0001.

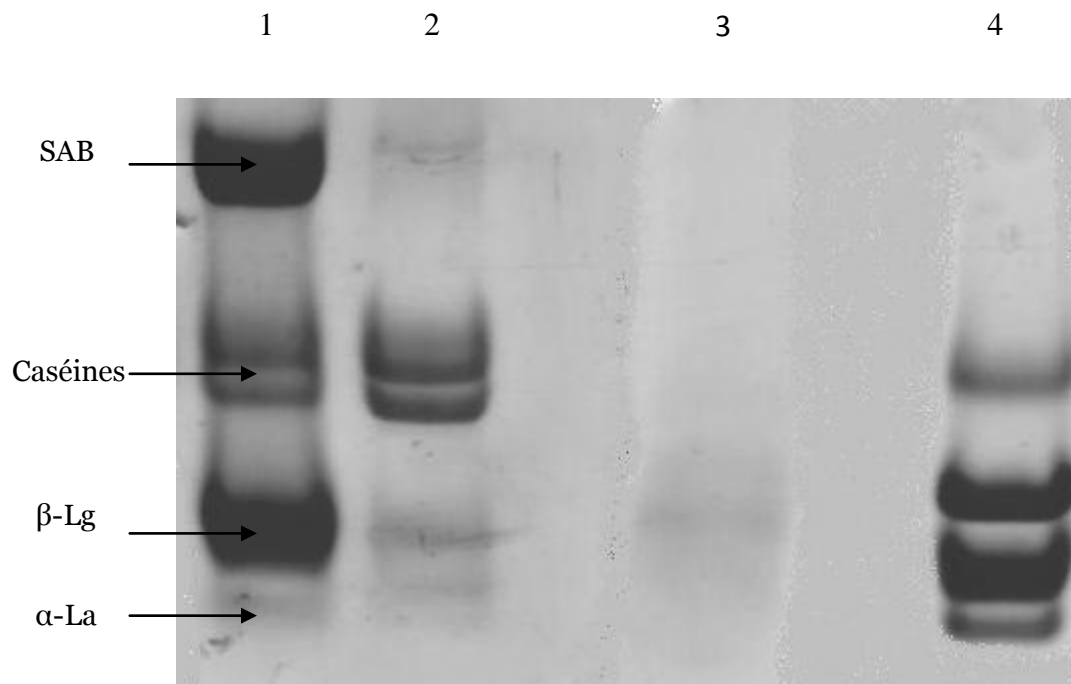


Figure 7. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS des protéines du lait de vache et de la préparation à base de protéines de riz hydrolysées.

1. Protéines de référence contenant : La SAB (68 000 Da), les Caséines (24 000 Da), la β-Lg (18 000 Da) et l'α-La (14 000 Da).

2. Lait de vache.

3. Préparation à base de protéines de riz (Modilac Expert Riz[®]).

4. Kit de référence peptidique contenant : Triose Phosphate Isomérase (*Rabbit Muscle*) : 26 600 Da, Myoglobine (*Horse Heart*) : 17 000 Da, α-lactalbumine (*Bovine Milk*) : 14 200 Da, Aprotinine (*Bovin Lung*) : 6 500 Da.

4-2. Effet de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées sur la croissance pondérale

Dans cette partie de travail, nous avons évalué les conséquences de la consommation d'un hydrolysate de protéines de riz sur l'évolution du poids corporel chez les souris (figures 8, 9, 10 et 11). Pendant l'expérience, on observe une évolution régulière du poids corporel des souris. A J_0 , le poids corporel de tous les groupes de souris est comparable, il n'est pas significativement différent ($19,50 \pm 0,25$ g). Cependant, on note une diminution très significative du poids corporel des souris nourries avec un hydrolysate de protéines de riz (groupes 1A et 2C) au cours des semaines 6, 7 et 8 par rapport aux témoins. Les valeurs obtenues durant ces 3 semaines pour les groupes 1A et 2C et témoin sont respectivement de ($26,26 \pm 0,34$ g) et ($26,37 \pm 0,25$ g) vs ($30,33 \pm 0,89$ g), ($25,74 \pm 0,40$ g) et ($25,83 \pm 0,42$ g) vs ($31,1 \pm 0,58$ g), ($24,02 \pm 0,57$ g) et ($23,42 \pm 0,39$ g) vs ($31,64 \pm 0,70$ g).

4-3. Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz chez les souris

La formule infantile à base de riz hydrolysé est administrée aux groupes expérimentaux pendant 28 jours après 35 jours d'immunisation à la β -Lg et l' α -La. Les figures 12 et 13 représentent le score cumulé, exprimé en volume consommé par semaine pour chaque groupe expérimental (groupes 1A et 2C) durant toute la période d'expérimentation (28 jours). Les valeurs obtenues pour les groupes 1A et 2C sont respectivement ($90 \pm 1,2$ ml) et ($85 \pm 1,2$ ml) pour la 1^{ère} semaine, ($120 \pm 1,02$ ml) et ($110 \pm 1,4$ ml) pour la 2^{ème} semaine, ($140 \pm 0,8$ ml) et ($135 \pm 1,3$ ml) pour la 3^{ème} semaine et ($170 \pm 0,76$ ml) et ($162,5 \pm 1,4$ ml) pour la 4^{ème} semaine.

4-4. Etude de l'antigénicité (titres sériques en anticorps anti β -Lg et anti α -La des souris Balb/c immunisées à la β -Lg et à l' α -La)

La révélation des IgG et IgE spécifiques anti β -Lg et α -La est effectuée par une technique de dosage spécifique des anticorps sur des sérums de souris Balb/c sensibilisées à la β -Lg et à l' α -La (n=10). Il s'agit de la méthode ELISA, c'est une technique très sensible qui permet de quantifier les anticorps IgG avec précision (Catherine et al., 2005).

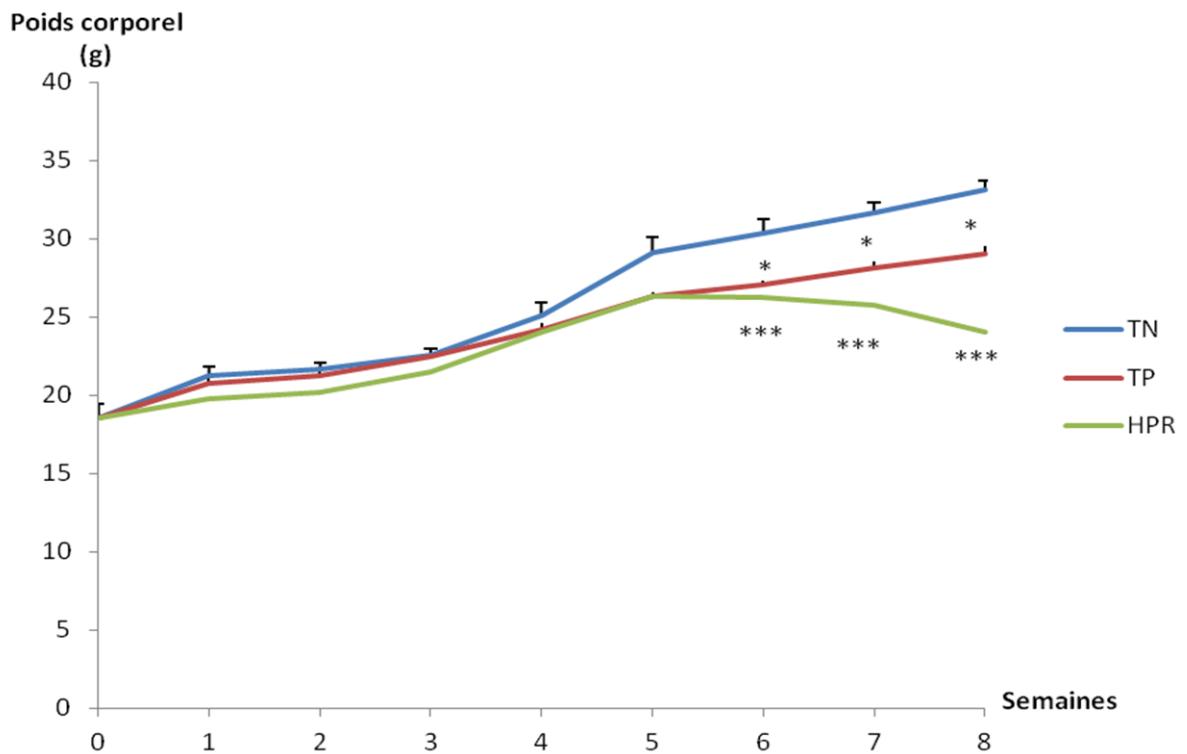


Figure 8. Croissance pondérale des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

TN : Témoin négatif

TP : Témoin positif

HPR : Souris immunisées à la β -Lg et nourries avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

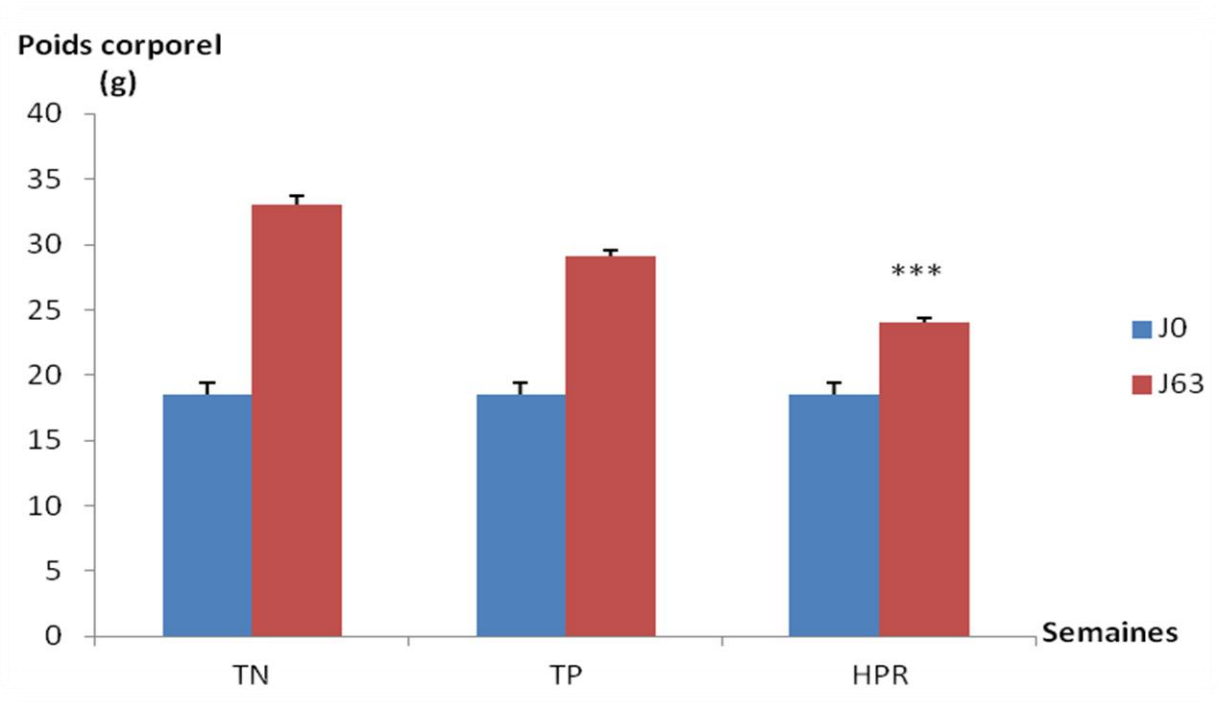


Figure 9. Croissance pondérale des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

*** $p < 0,001$.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris immunisées à la β -Lg et nourries avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

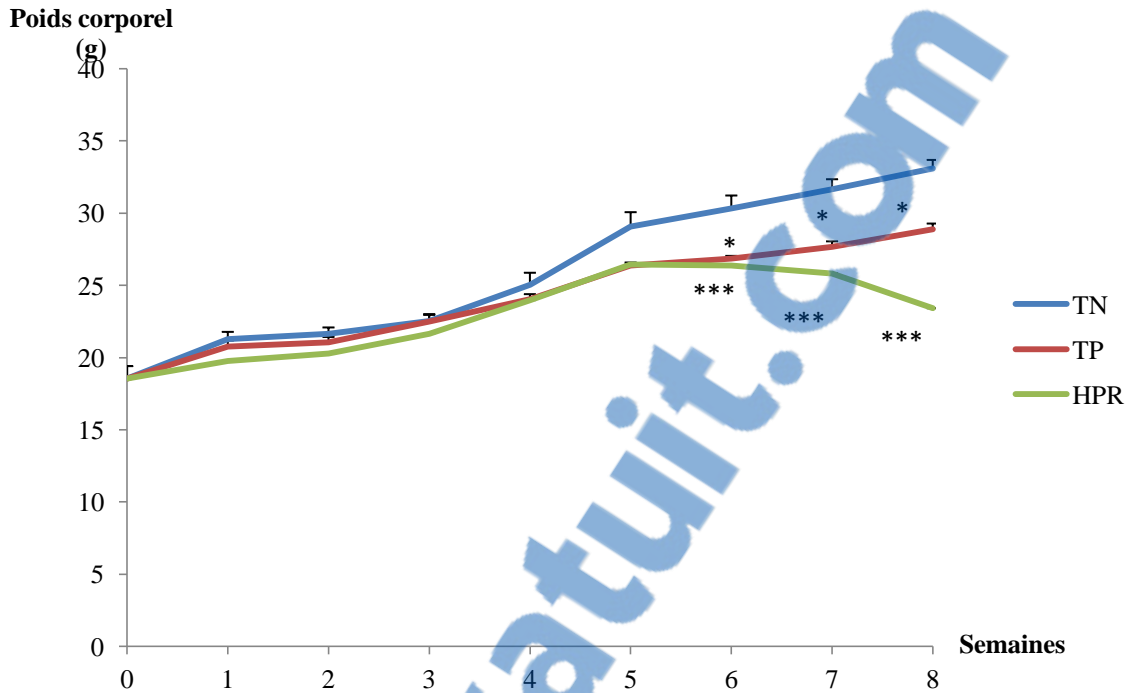


Figure 10. Croissance pondérale des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris immunisées à l' α -La et nourries avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

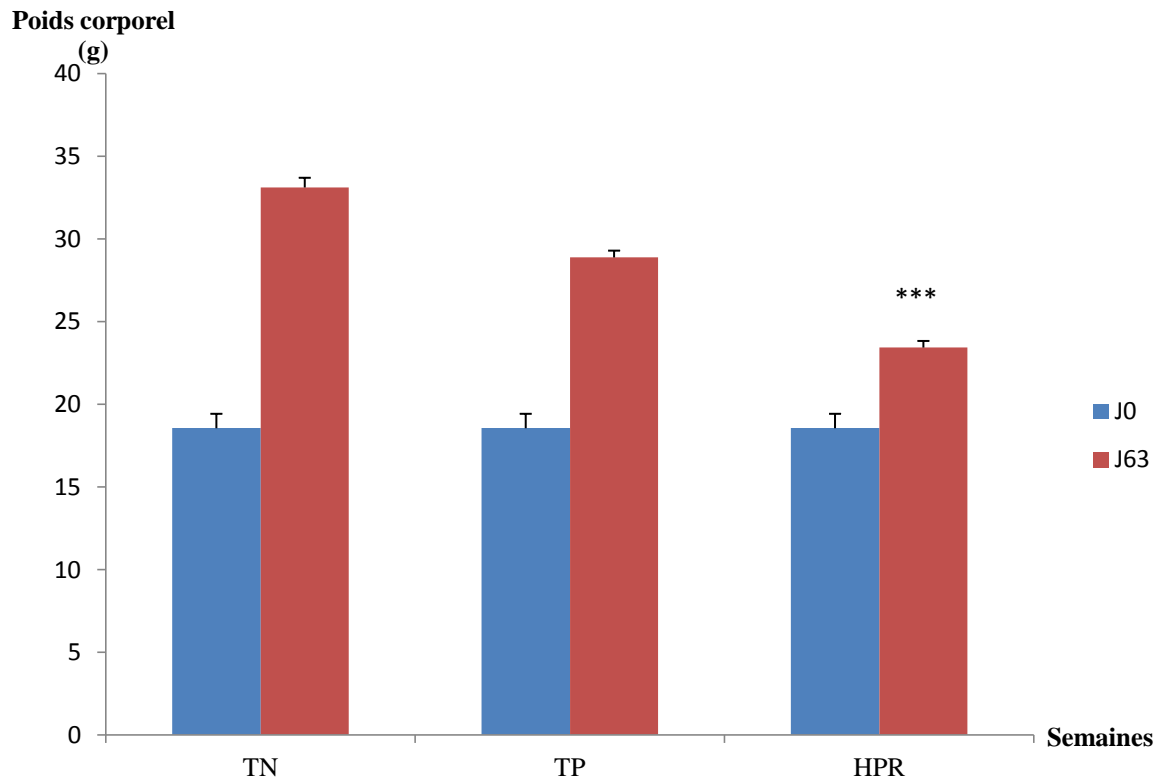


Figure 11. Croissance pondérale des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours .

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

*** $p < 0,001$.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris immunisées à l' α -La et nourries avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours.

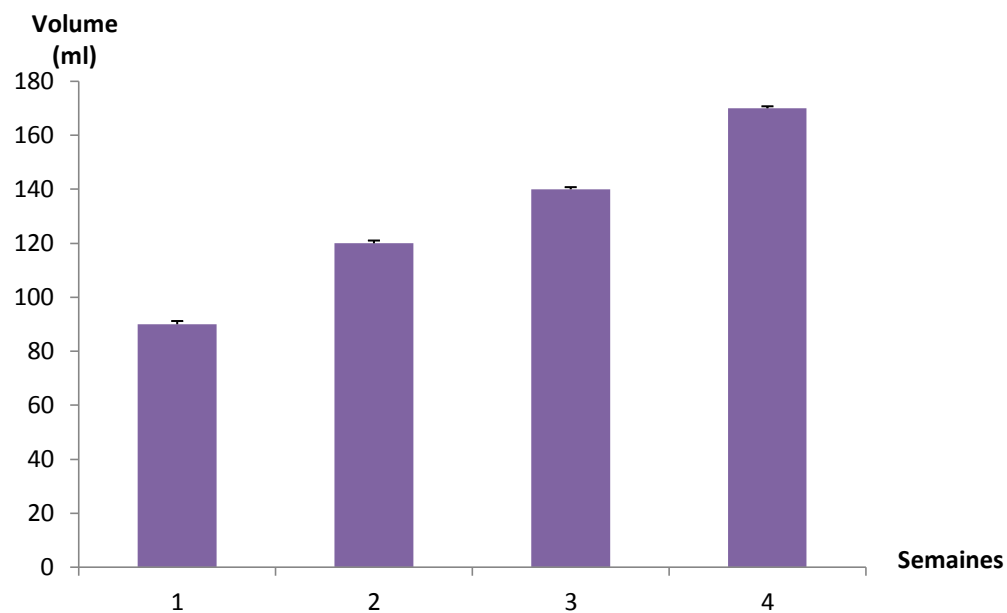


Figure 12. Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours d'expérimentation des souris immunisées à la β -Lg.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

1 : 1^{ère} semaine.

2 : 2^{ème} semaine.

3 : 3^{ème} semaine.

4 : 4^{ème} semaine.

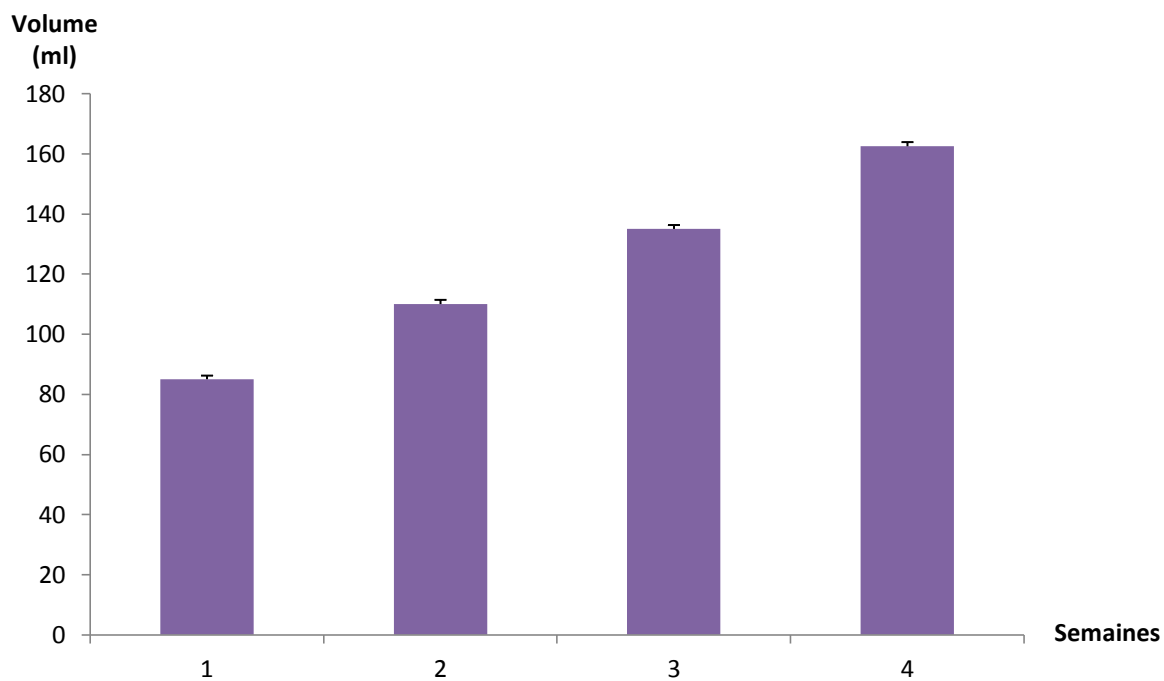


Figure 13. Consommation de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours d'expérimentation des souris immunisées à l' α -La.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

1 : 1^{ère} semaine.

2 : 2^{ème} semaine.

3 : 3^{ème} semaine.

4 : 4^{ème} semaine.

4-4.1. Titres sériques en IgG

A J₀, avant toute immunisation, le titre sérique en IgG anti β-Lg et α-La est indétectable dans les sérums des souris du protocole.

Après 35 jours d'immunisation, ces anticorps sont produits à un taux significativement élevé, atteignant un titre de 1/1000000^{ème}, ce qui est très fortement significatif ($p < 0,001$) (figures 14 et 15).

Au 63^{ème} jour, les titres en IgG anti β-Lg et α-La sont significativement diminués chez les souris ayant consommées de l'hydrolysate à base de protéines de riz.

4-4.2. Titres sériques en IgE

Le titre sérique en IgE anti β-Lg et anti α-La est de 1/25^{ème} ($p < 0,001$) (figure 16, figure 17). Cette présence des IgE dans les sérums des souris immunisées à la β-Lg et α-La traduit une réponse immunitaire IgE dépendante.

4-4.3. Etudes de la réactivité immunologique

4-4.3.1. Mesure de la réactivité de l'hydrolysate de protéines de riz

La préparation infantile à base de protéines de riz hydrolysées est mise en contact en premier temps avec les sérums des souris immunisées à la β-Lg, α-La et après consommation des souris à cette formule lactée.

Les résultats obtenus à J₃₅ sont les même obtenus au 63^{ème} jour, après ingestion de la préparation infantile (figures 18 et 19), qui montrent que la préparation infantile à base de protéines de riz hydrolysées ne réagit pas avec les anticorps IgG sériques anti β-Lg ni avec les anticorps IgG anti α-La.

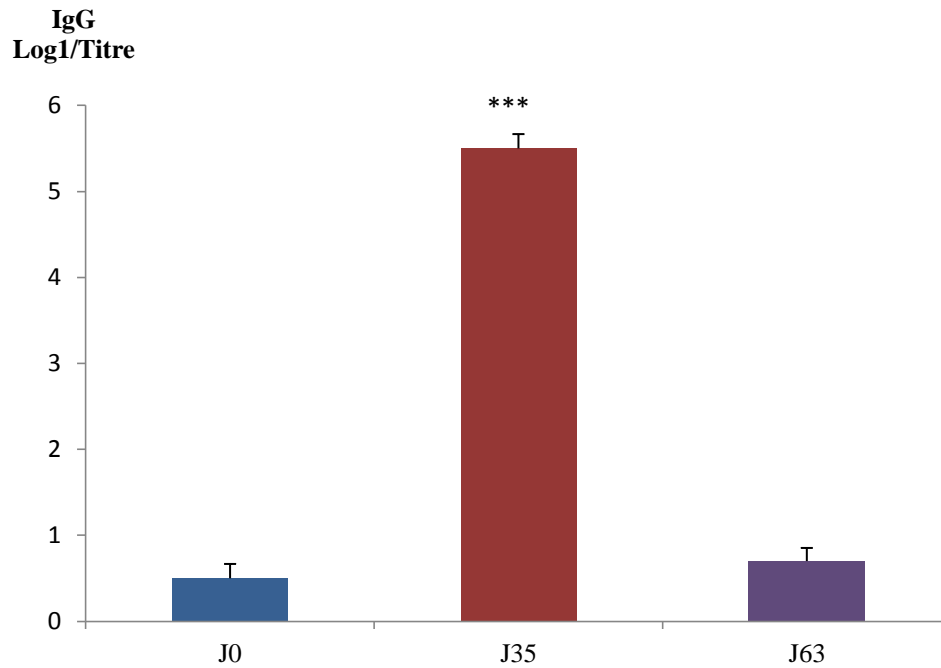


Figure 14. Titre en IgG sériques spécifiques mesurés par la méthode ELISA à J₀, J₃₅ et à J₆₃, chez des souris Balb/c immunisées à la β-Lg et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

(J₀) Titre avant toute immunisation.

(J₃₅) Titre après 35 jours d'immunisation.

(J₆₃) Titre après consommation d'un hydrolysat de protéines de riz.

*** p < 0,001.

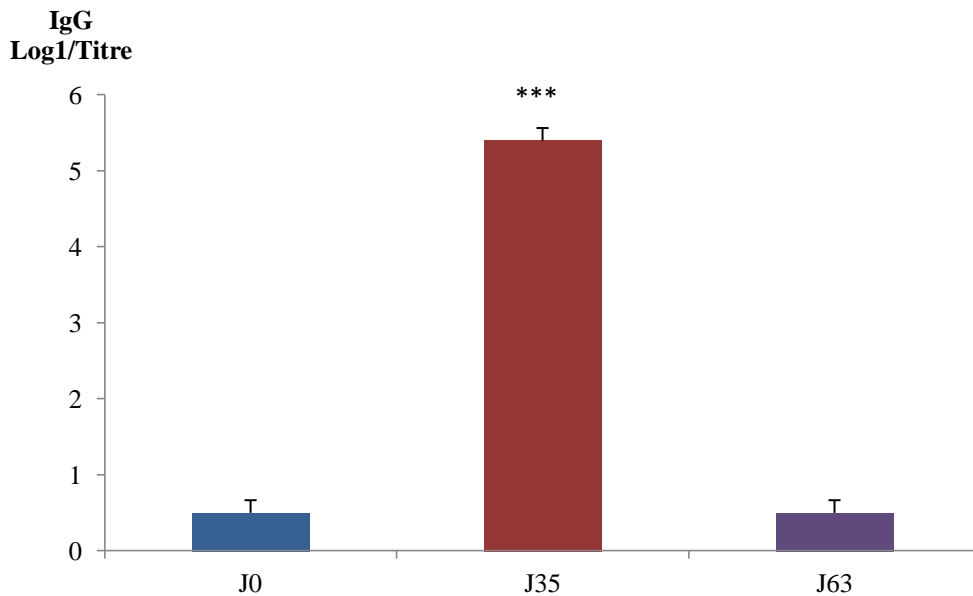


Figure 15. Titre en IgG sériques spécifiques mesurés par la méthode ELISA à J₀, à J₃₅ et à J₆₃, chez des souris Balb/c immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysate de protéines de riz (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

(J₀) Titre avant toute immunisation.

(J₃₅) Titre après 35 jours d'immunisation.

(J₆₃) Titre après consommation d'un hydrolysate de protéines de riz.

*** p < 0,001.

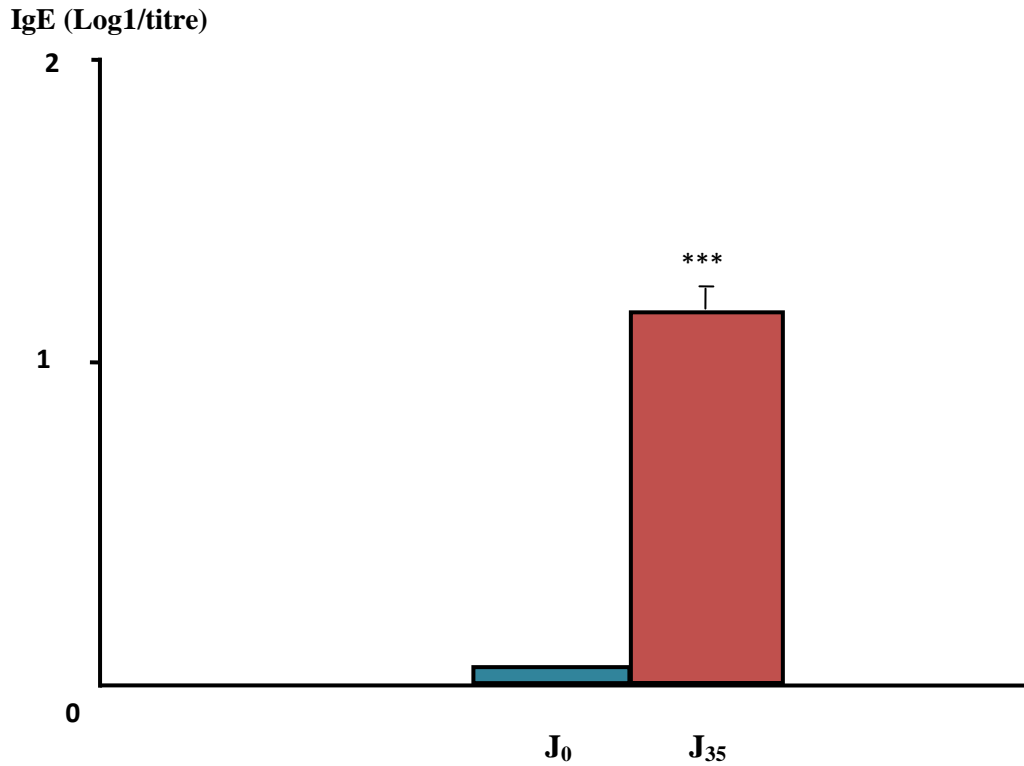


Figure 16. Titre en IgE sériques spécifiques mesurées par la méthode ELISA à J₀ et à J₃₅, chez des souris Balb/c immunisées à la β-Lg.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards (n=10).

(J₀) Titre avant toute immunisation.

(J₃₅) Titre après 35 jours d'immunisation.

*** p < 0,001.

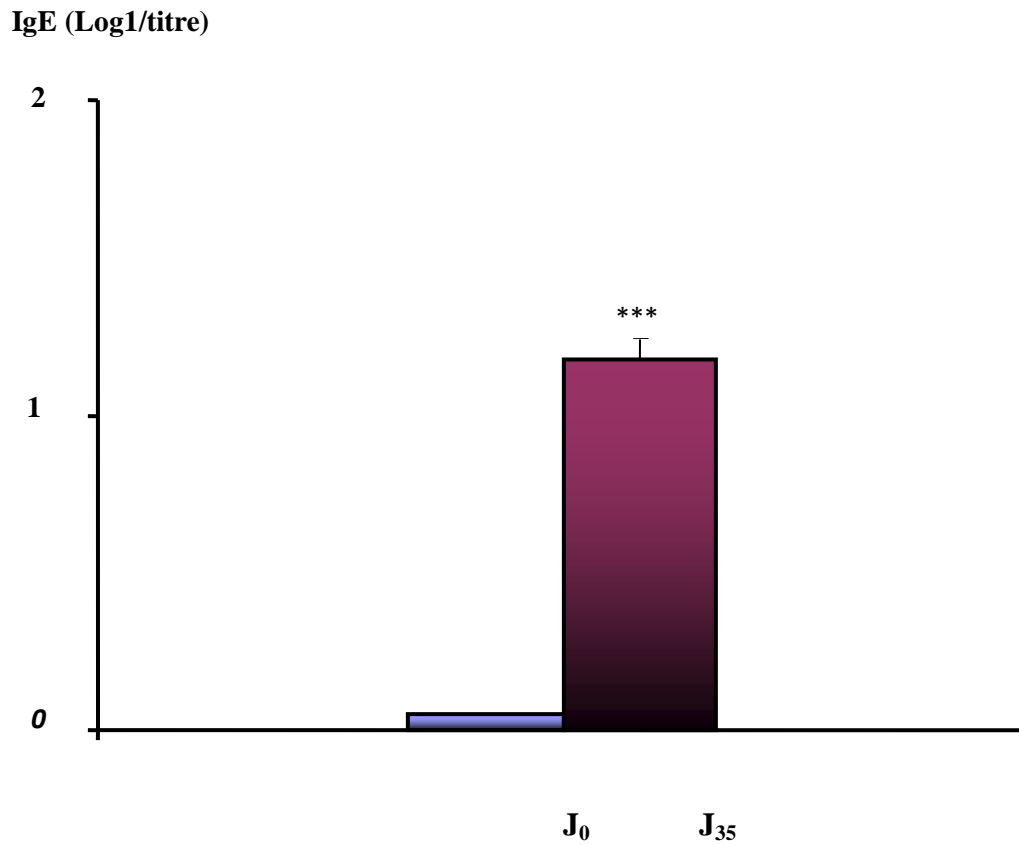


Figure 17. Titre en IgE sériques spécifiques mesurées par la méthode ELISA à J₀ et à J₃₅, chez des souris Balb/c immunisées à la α -La.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards (n=10).

(J₀) Titre avant toute immunisation.

(J₃₅) Titre après 35 jours d'immunisation.

*** p < 0,001.

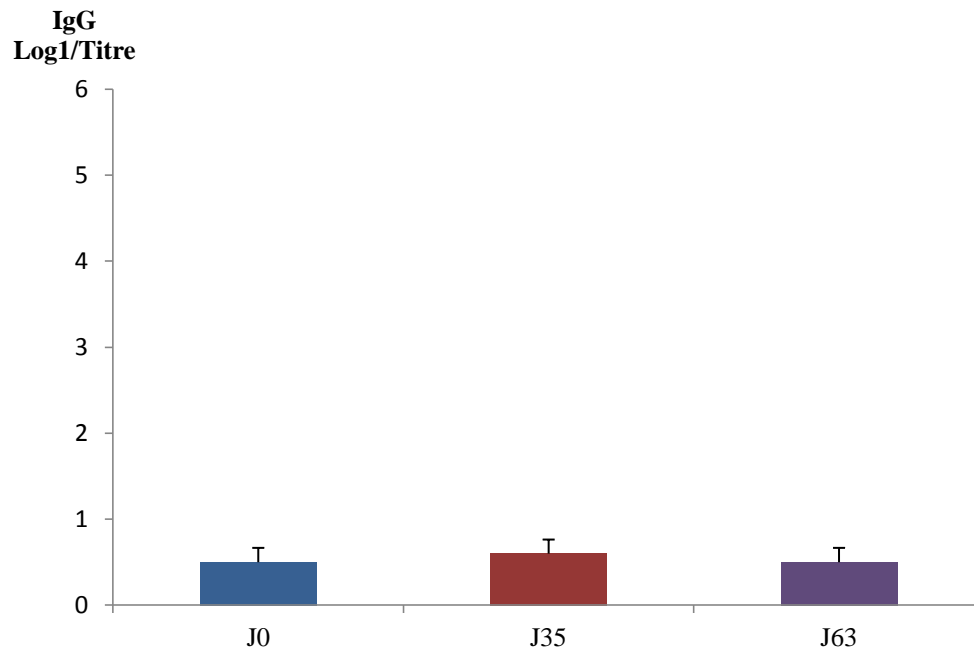


Figure 18. Réactivité de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées avec les IgG anti β -Lg bovine (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

(J₀) avant toute immunisation.

(J₃₅) après 35 jours d'immunisation.

(J₆₃) après consommation d'un hydrolysat de protéines de riz.

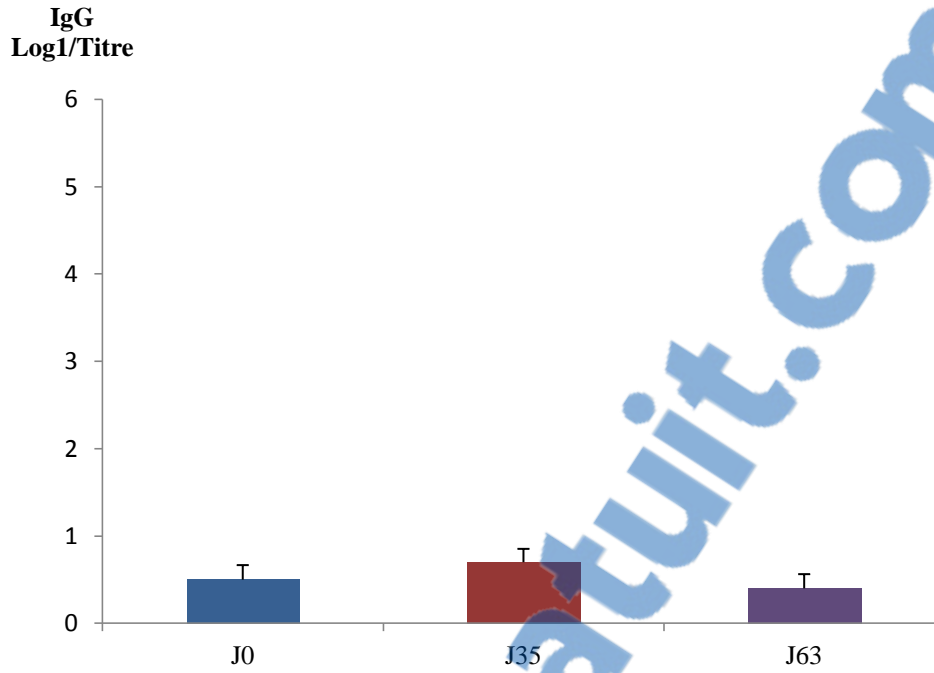


Figure 19. Réactivité de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées avec les IgG anti α -La (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

(J₀) avant toute immunisation.

(J₃₅) après 35 jours d'immunisation.

(J₆₃) après consommation d'un hydrolysate de protéines de riz.

4-5. Etude histologique

L'objectif de cette partie de notre travail est de vérifier les conséquences d'un régime à base d'hydrolysats de protéines de riz sur la structure de l'épithélium intestinal, particulièrement au niveau de l'architecture villositaire ainsi que sur la composition en lymphocytes intra-épithéliaux.

Cette étude est effectuée sur des fragments de jéjunums des souris sensibilisées à la β -Lg et α -La ayant ingérées l'hydrolysate à base de riz, des souris témoins positifs immunisées à la β -Lg et α -La n'ayant pas ingérées la formule à base de riz et des souris témoins négatifs non immunisées et nourries au régime standard.

4-5.1. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs

Observé au microscope optique, l'aspect de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs, révèle un aspect régulier avec formation de nombreuses projections en doigts de gant: il s'agit des villosités séparées par les sillons intervillositaires communiquant (figure 20).

Sur le plan structural, la muqueuse intestinale présente des villosités qui apparaissent longues et fines, bordées par un épithélium simple unistratifié, constitué de cellules hautes à plateau strié pourvues de noyaux réguliers en position basale. Le chorion est d'aspect fibreux et apparaît polymorphe contenant diverses cellules immunitaires, peu abondantes.

4-5.2. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins positifs

La muqueuse intestinale des souris témoins positifs présente une atrophie très prononcée et une infiltration lymphocytaire importante. Ces atrophies sont caractérisées par des villosités élargies, aplaties bordées par un épithélium ayant un aspect pseudostratifié et possédant des cellules cubiques comportant des noyaux dystrophiques. Au niveau du chorion, l'inflammation est très prononcée (figures 21 et 22).

4-5.3. Histologie de la muqueuse intestinale des souris ayant suivi un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz

L'aspect de la muqueuse intestinale des souris ayant suivi un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz indique une amélioration au niveau de la structure de la muqueuse intestinale comparé aux témoins positifs, les villosités sont de plus en plus longues et fines, bordées par un épithélium simple unistratifié cylindrique qui est formée de hautes cellules à plateau strié

possédant des noyaux réguliers en position basales qui correspondent aux entérocytes (figures 23 et 24). Le chorion est d'aspect fibreux et apparaît polymorphe possédant divers éléments mononucléés et sont peu abondants et qui correspondent à des cellules du système immunitaire: les lymphocytes. La hauteur villositaire indique une différence hautement significative par rapport aux groupes témoins positifs.

4-6. Evaluation de la hauteur villositaire intestinale des souris ayant suivis un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz

La hauteur villositaire des souris témoins négatifs et des témoins positifs est respectivement de ($48 \pm 1,06 \mu\text{m}$) et ($5,12 \pm 0,50 \mu\text{m}$, $p < 0,001$). On a obtenu une hauteur villositaire de moyenne de ($21,50 \pm 2,04 \mu\text{m}$) pour le groupe immunisé avec la β -Lg et de ($20,86 \pm 1,76 \mu\text{m}$) pour le groupe immunisé à l' α -La (figures 25 et 26).

Chez les groupes expérimentaux, la consommation d'un hydrolysate de protéines de riz ne provoque pas d'atrophie villositaire comparée aux groupes témoins positifs. Nous avons enregistré une restructuration de la muqueuse intestinale.

4-7. Comptage des lymphocytes intra-épithéliaux (L.I.E)

Le dénombrement des lymphocytes intra-épithéliaux permet de comparer le nombre de ces derniers dans les différents échantillons d'intestin. Un nombre élevé des lymphocytes intra-épithéliaux est un signe d'inflammation.

Le dénombrement des lymphocytes est estimé approximativement en pourcentage (%) dans les différents fragments jéjunaux et nous avons comparé ce nombre à celui des souris témoins négatifs. Le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des souris des groupes témoins positifs est hautement élevé comparé aux groupes témoins négatifs. Nous remarquons que le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des souris immunisées avec la β -Lg et à l' α -La ayant consommés par la suite de l'hydrolysate de protéines de riz est comparable à celui du groupe de souris témoin négatif, avec une différence de 0,6% pour le groupe immunisé avec la β -Lg et 0,4% pour le groupe immunisé avec l' α -La (figures 27 et 28).

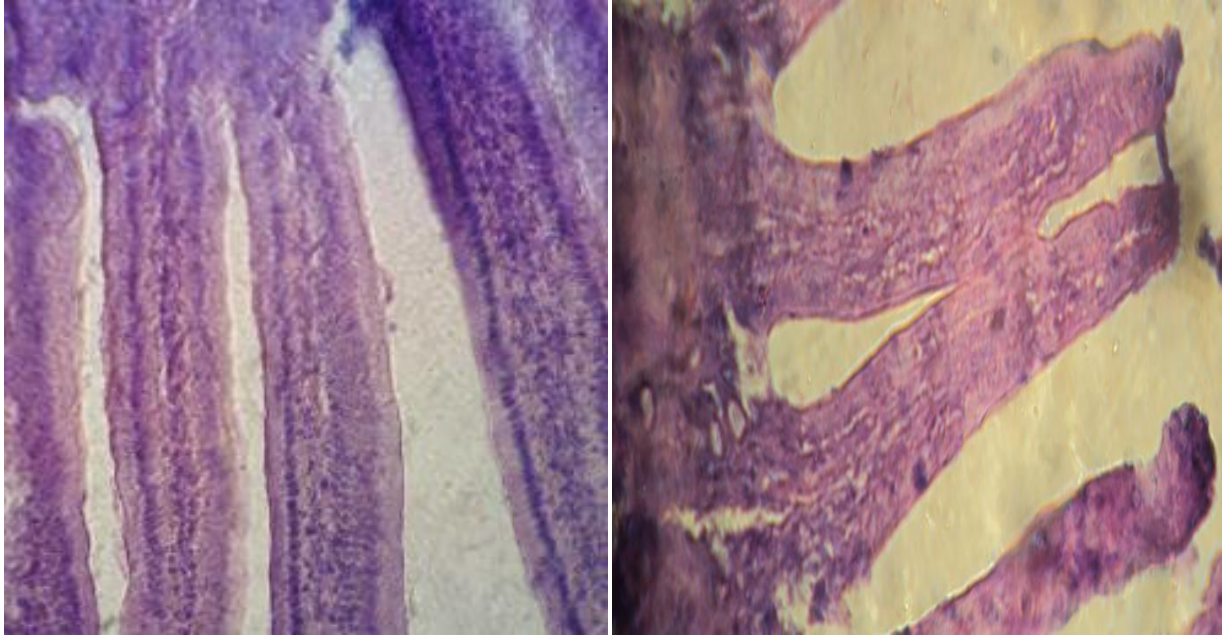
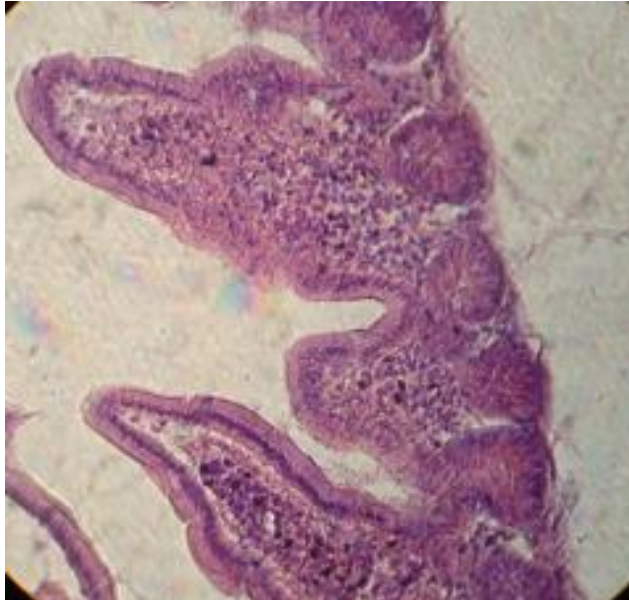


Figure 20. Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalum-éosine des souris témoins négatifs.

La muqueuse intestinale apparait formée de nombreuses projections en doigts de gant: il s'agit des villosités séparées par les sillons intervillositaires communiquant.

Sur le plan structural, la muqueuse intestinale présente des villosités qui apparaissent longues et fines, bordées par un épithélium simple unistratifié.



G (10x40)



G (10x10)

Figure 21. Observations microscopiques des fragments de jéjunum au microscope optique G (10x10) et G (10x40) colorés à l'hémalun-éosine des souris témoins positifs immunisées à la β -Lg.

Les villosités intestinales sont raccourcies, déformées et élargies bordées par un épithélium pseudo stratifié. L'infiltrat lymphocytaire au niveau du chorion est dense.



Atrophie des
villosités
intestinales

Figure 22. Observation microscopique G (10x40) d'un fragment de jéjunum coloré à l'hémalum-éosine d'une souris témoin positif immunisée à l' α -La.

Des villosités aplaties bordées par un épithélium ayant un aspect pseudostratifié et possédant des cellules cubiques comportant des noyaux dystrophiques. Au niveau du chorion, l'inflammation est très prononcée.

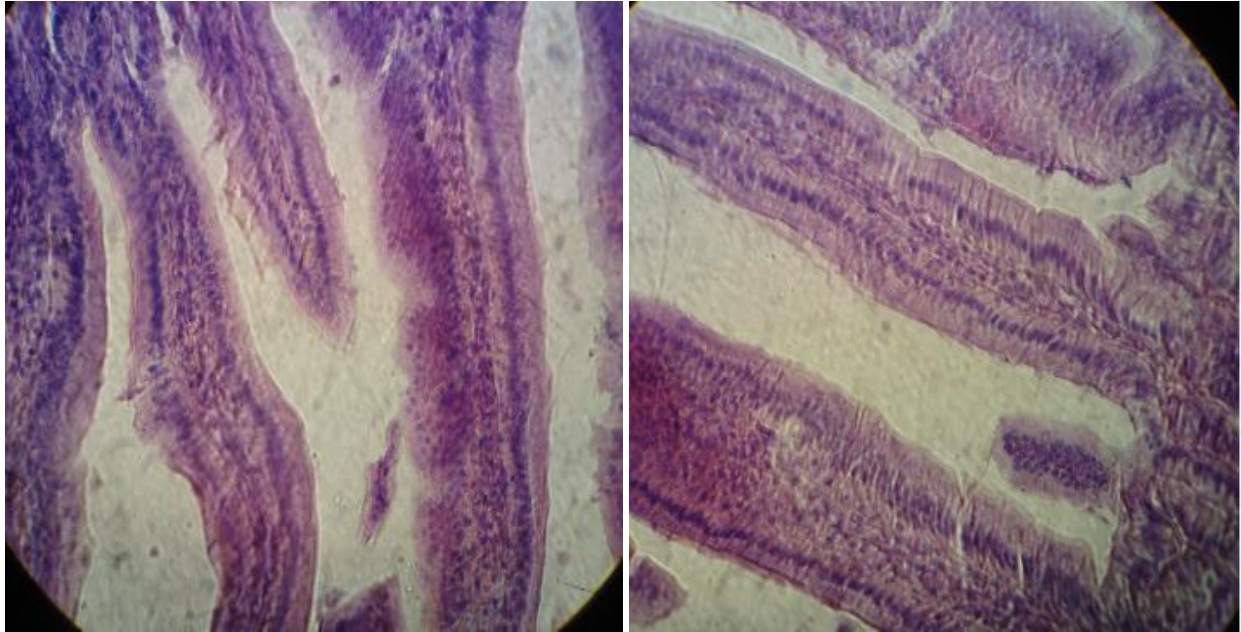


Figure 23. Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalun-éosine des souris immunisées à la β -Lg, nourries ensuite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.

On remarque un rétablissement de l'atrophie des villosités intestinales.

Les villosités intestinales sont comparables aux témoins négatifs. Les villosités sont de plus en plus longues et fines, il n'y a pas d'infiltration lymphocytaire au niveau du chorion.

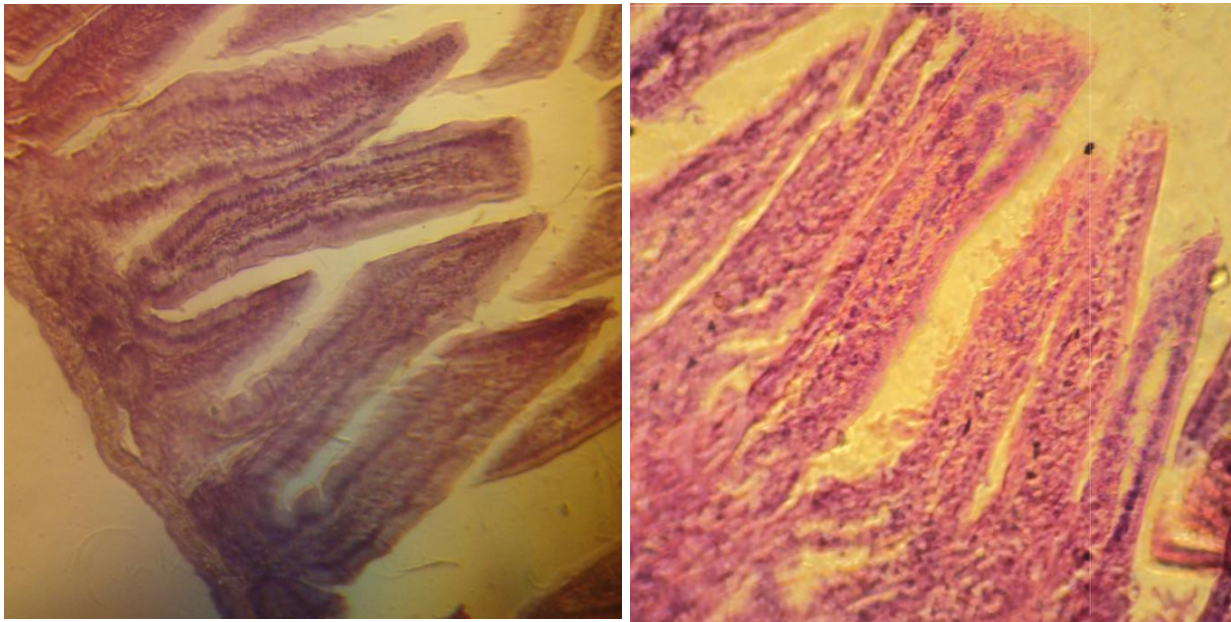


Figure 24. Observations microscopiques G (10x40) des fragments de jéjunum colorés à l'hémalum-éosine des souris immunisées à l' α -La nourries ensuite avec un hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.

On remarque un rétablissement de l'atrophie des villosités intestinales

Les villosités sont de plus en plus longues et fines, bordées par un épithélium simple unistratifié cylindrique qui est formé de hautes cellules à plateau strié possédant des noyaux réguliers en position basales qui correspondent aux entérocytes.

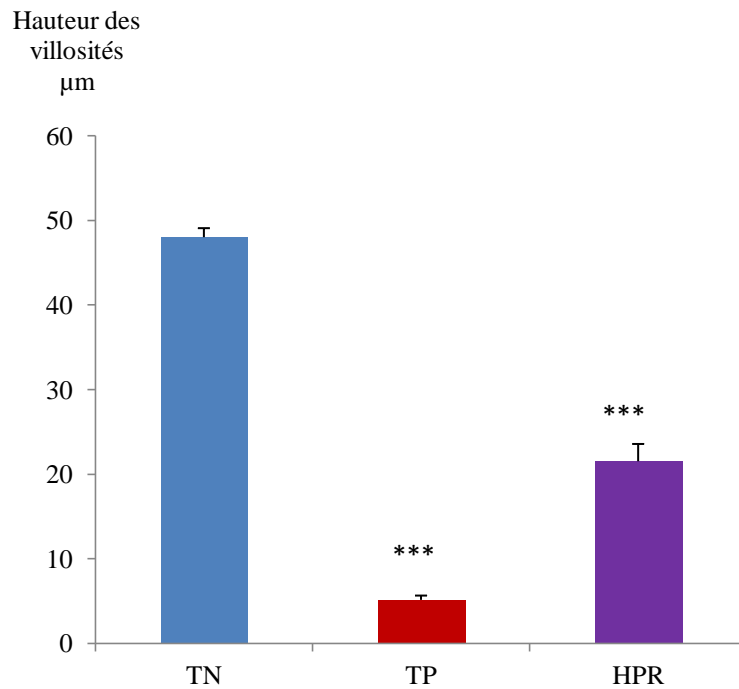


Figure 25. Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris immunisées à la β -Lg et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéine de riz pendant 28 jours, comparée à celle des souris témoins négatifs et positifs (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris nourries avec l'hydrolysat de protéines de riz.

*** $p < 0,001$.

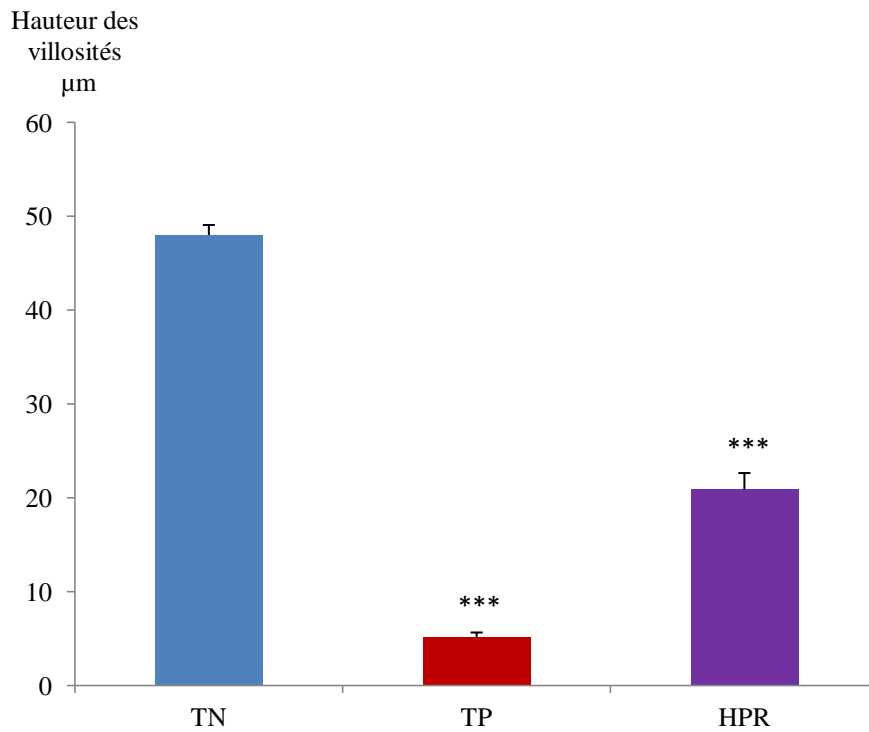


Figure 26. Evaluation de la hauteur villositaire des fragments jéjunaux des souris immunisées à l' α -La et nourries par la suite avec un hydrolysat de protéines de riz pendant 28 jours, comparée à celle des souris témoins négatifs et positifs (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris nourries avec l'hydrolysat de protéines de riz.

*** $p < 0,001$.

Lymphocytes/100 entérocytes

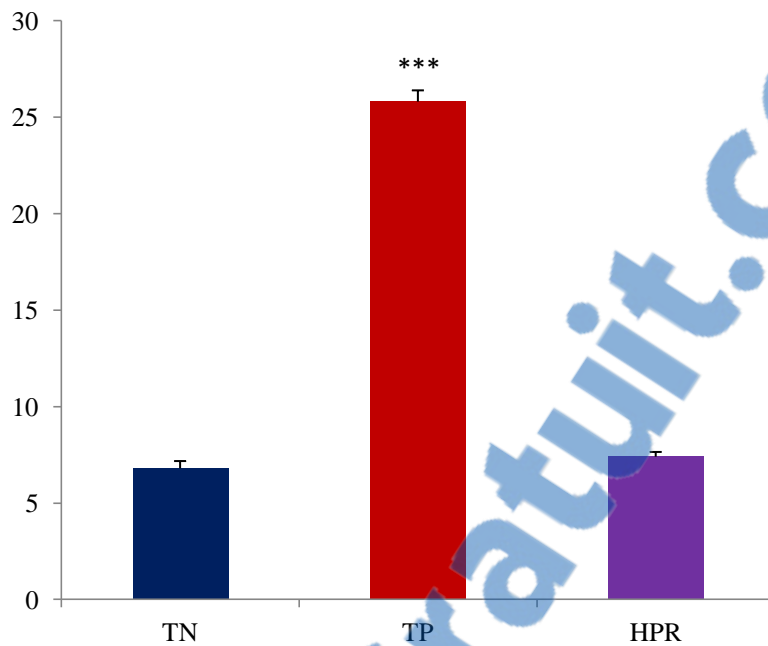


Figure 27. Effet du régime à base de protéines de riz sur le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des villosités intestinales des fragments jéjunaux des souris immunisées à la β -Lg comparé aux témoins négatifs et positifs (n=10).

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris nourries avec l'hydrolysate de protéines de riz.

*** $p < 0,001$.

Lymphocytes/100 entérocytes

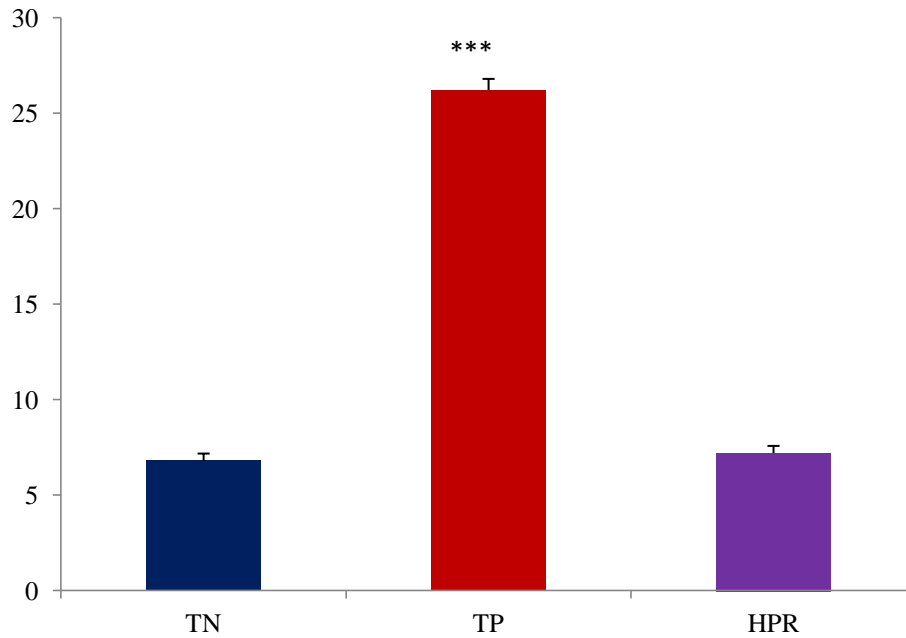


Figure 28. Effet du régime à base de protéine de riz sur le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux des villosités intestinales de fragments jéjunaux des souris immunisées à l' α -La comparé aux témoins négatifs et positifs.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standard.

TN : Témoin négatif.

TP : Témoin positif.

HPR : Souris nourries avec l'hydrolysate de protéines de riz.

*** $p < 0,001$.

4-8. Test de provocation in vitro en chambre Ussing

Etude in vitro de l'interaction des protéines sensibilisantes, du lait de vache, lait infantile standard, formule infantile à base de soja et formule infantile à base de riz hydrolysé avec les muqueuses de souris sensibilisées à la β -Lg et α -La.

Le but de cette partie du travail est de rechercher l'existence d'une éventuelle réponse anaphylactique locale après stimulation de la muqueuse jéjunale de souris sensibilisées avec la β -Lg et α -La avec les protéines des différentes formules infantiles (standard, soja, riz).

Pour rappel, la chambre de Ussing permet de mesurer les paramètres électrophysiologiques : courant de court circuit (I_{sc} , $\mu A/cm^2$), différence de potentiel (DDP, mV) et la conductance (G, mmho/cm²) qui caractérisent les tissus des animaux préalablement sensibilisés à la β -Lg, α -La ainsi que ceux des témoins.

Les mesures sont effectuées en deux étapes, la première est la mesure des paramètres électrophysiologiques effectuée à l'état basal et qui dure entre 10 et 15 minutes. Elle se fait avant toute stimulation des tissus soit avec l'antigène sensibilisant β -Lg, α -La, le lait de vache, la préparation standard, préparation à base de soja ou celui de la formule à base de riz hydrolysé.

La deuxième mesure est effectuée après le dépôt, soit des protéines sensibilisantes β -Lg, α -La, le lait de vache ou les laits infantiles dans le compartiment séreux. Cette mesure est réalisée durant les premières cinq minutes, puis à dix minutes de la stimulation.

4-8.1. Effet sur l' I_{sc}

L' I_{sc} ou courant de court circuit ($\mu A/cm^2$) correspond à la somme algébrique des flux ioniques de part et d'autre de l'épithélium intestinal. Dans un modèle d'allergie, son augmentation traduit le plus souvent une sécrétion électrogénique du chlore Cl^- .

4-8.1.1. Effet de la β -Lg et α -La sur le courant de court circuit tissulaire l' I_{sc}

Des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg sont montés en chambre de Ussing et stimulés par le dépôt de la protéine sensibilisante β -Lg à la concentration de 60 $\mu g/ml$ dans le compartiment séreux. On note une augmentation significative dans les valeurs de l' I_{sc} après dépôt de la β -Lg, qui passe des valeurs de bases de $40,88 \pm 5,34 \mu A/cm^2$ à $56,10 \pm 5,12 \mu A/cm^2$ ($\Delta I_{sc} = 15,22 \pm 0,94 \mu A/cm^2$, $p < 0,001$).

Pour les souris immunisées à l' α -La et stimulées par l' α -La, les valeurs de bases de l'Isc passent de $39,88 \pm 5,71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $57,004 \pm 5,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 17,12 \pm 0,78 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $p < 0,001$).

En comparaison, la stimulation des intestins de souris naïves (non immunisées) par la β -Lg ou α -La n'entraîne aucune variation significative de l'Isc (figure 29, figure 30).

Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une réaction anaphylactique locale produite par l'interaction directe des antigènes sensibilisants avec les cellules immunocompétentes de la muqueuse intestinale des animaux sensibilisés à la β -Lg ou à l' α -La.

4-8.1.2. Effet de l'ovalbumine sur l'Isc

Afin de montrer que l'augmentation de l'Isc des fragments de souris sensibilisées est spécifique à la protéine sensibilisante, l'ovalbumine a été testée dans le compartiment séreux ($60\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les mêmes conditions d'expérience. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des témoins non sensibilisés et traités selon la même procédure (figure 31).

Nos résultats indiquent que le dépôt d'ovalbumine dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés ou des témoins ne se traduit par aucun effet significatif sur l'Isc.

4-8.1.3. Effet du lait de vache sur le courant de court circuit

Le dépôt du lait de vache à la concentration de $60 \text{ mg}/\text{ml}$ dans le compartiment séreux stimule l'augmentation de l'Isc des tissus des animaux sensibilisées à la β -Lg, les valeurs de bases passent de $66,15 \pm 6,68 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $78,95 \pm 6,74 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 12,8 \pm 0,99$ $p < 0,001$).

Pour les souris immunisées à l' α -La et stimulées par le lait de vache, les valeurs de bases de l'Isc passent de $72,89 \pm 2,96 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $88,058 \pm 2,60 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 15,16 \pm 0,57$ $p < 0,001$).

Ces résultats suggèrent l'existence d'une réaction anaphylactique locale due à l'interaction directe de l'antigène sensibilisant (β -Lg ou l' α -La) avec les muqueuses des fragments jéjunaux (figure 32).

4-8.1.4. Effet des préparations infantiles (Standard, Soja, Riz hydrolysé) sur l'Isc

Le dépôt de $60\mu\text{g}/\text{ml}$ du lait standard ou la formule à base de Soja dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés à la β -Lg provoque une augmentation très significative de l'Isc. Pour la préparation standard, les valeurs de bases passent de $53,11 \pm 6,66 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $67,87 \pm 6,43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 14,76 \pm 1,66$, $p < 0,001$), et de $41,25 \pm 6,72 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $59,22 \pm 6,44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 17,97 \pm 1,47$, $p < 0,001$) pour la formule à base de Soja.

La même réponse est obtenue lorsque les tissus des animaux sensibilisés à l' α -La sont stimulés par ces formules infantiles. Pour la préparation standard, les valeurs de bases passent de $24,92 \pm 0,23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $40,44 \pm 2,29 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 15,52 \pm 2,06$, $p < 0,001$), et de $47,84 \pm 5,66 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $60,48 \pm 2,04 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\Delta\text{Isc} = 12,64 \pm 3,61$, $p < 0,001$) pour la formule à base de Soja.

En revanche, les valeurs de l'Isc restent inchangées lorsque les tissus des animaux sensibilisés à la β -Lg ou l' α -La sont stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé (figure 33, figure 34, figure 35), (tableau 17).

4-8.1.5. L'augmentation du courant de court circuit (ΔIsc)

Les valeurs de ΔIsc pour les protéines allergisantes β -Lg, α -La, le lait de vache, le lait Standard, la formule infantile à base de Soja et la formule à base de riz hydrolysé sont représentées dans le tableau 18.

4-8.2. Effet sur la DDP

Nos résultats montrent que le dépôt de la β -Lg, α -La, le lait de vache et le lait standard ainsi que la formule à base de Soja et la formule à base de riz hydrolysé sur des tissus d'animaux sensibilisés ne produit aucune modification des valeurs de base de la DDP. Les valeurs de la DDP sont rapportées dans les figures 36, 37, 38, 39, 40, 41.

4-8.3. Effet sur la conductance

4-8.3.1. Effet de la β -Lg et l' α -La sur la conductance (G)

Figures 42,43 représentent les variations de la conductance des tissus d'animaux mis en contact avec les allergènes (β -Lg, α -La). Les valeurs de G augmentent de $34,71 \pm 2,64 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ à $51,21 \pm 3,53 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ ($p < 0,001$) chez les souris immunisées et stimulées avec la β -Lg et de $34,71 \pm 2,64 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ à $51,51 \pm 3,37 \text{ mmho}/\text{cm}^2$ ($p < 0,001$) chez les souris immunisées et stimulées avec l' α -La. Cette augmentation de la conductance est synonyme d'une diminution de la résistance, par un relâchement de la muqueuse. Ce relâchement peut être expliqué physiologiquement par une augmentation de la perméabilité intestinale dans l'allergie aux protéines alimentaire.

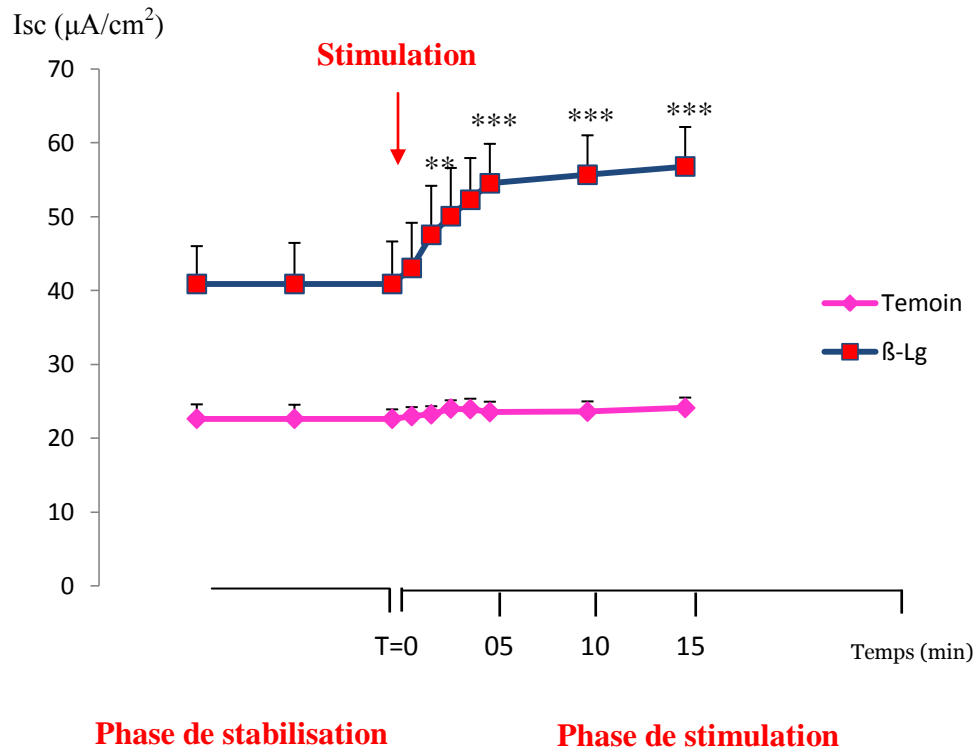


Figure 29. Effet de la β -Lg sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, l'antigène sensibilisant (β -Lg) est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

β -Lg (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

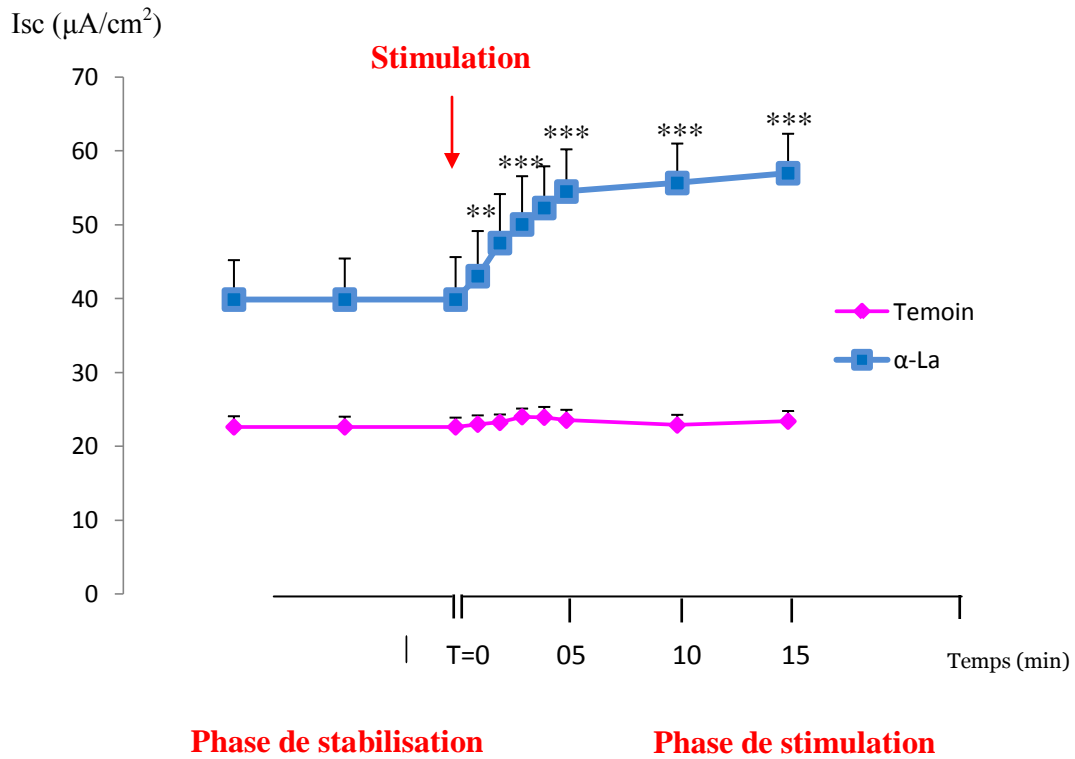


Figure 30. Effet de l' α -La sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, l'antigène sensibilisant (α -La) est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

α -La (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

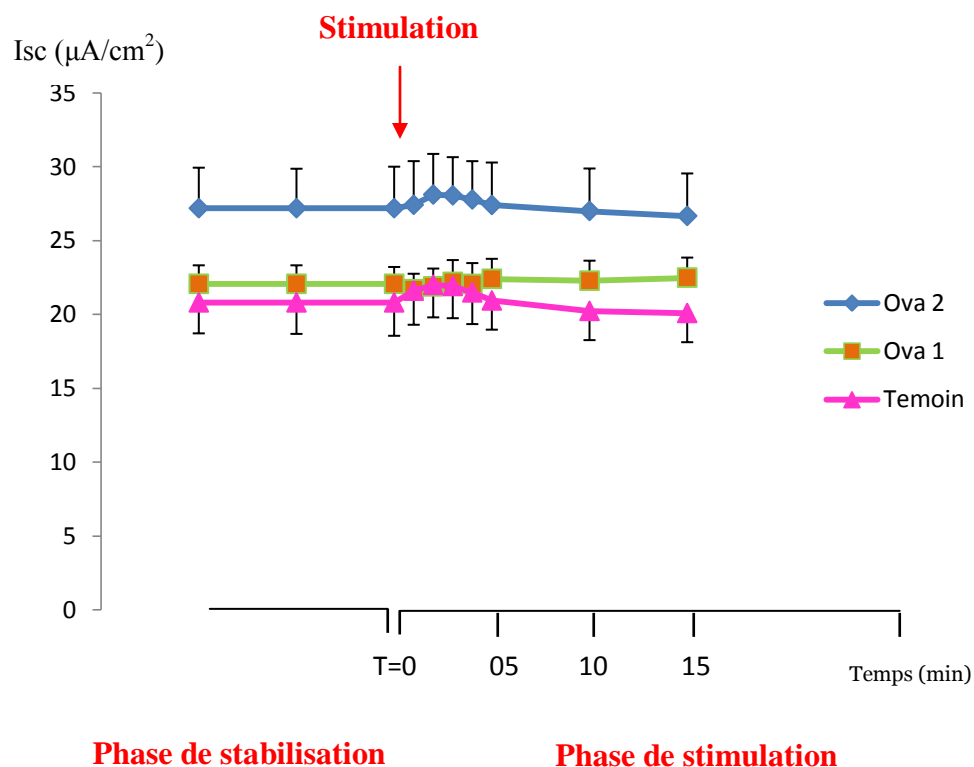


Figure 31. Effet non spécifique de l'ovalbumine (60μg/ml, côté séreux) sur l'évolution du courant de court-circuit mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β-Lg et α-La.

Le dépôt de l'ovalbumine est sans effet significatif sur l'Isc des tissus des souris immunisées.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

Ova₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β-Lg native et stimulés avec l'ovalbumine.

Ova₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l'α-La native et stimulés avec l'ovalbumine.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

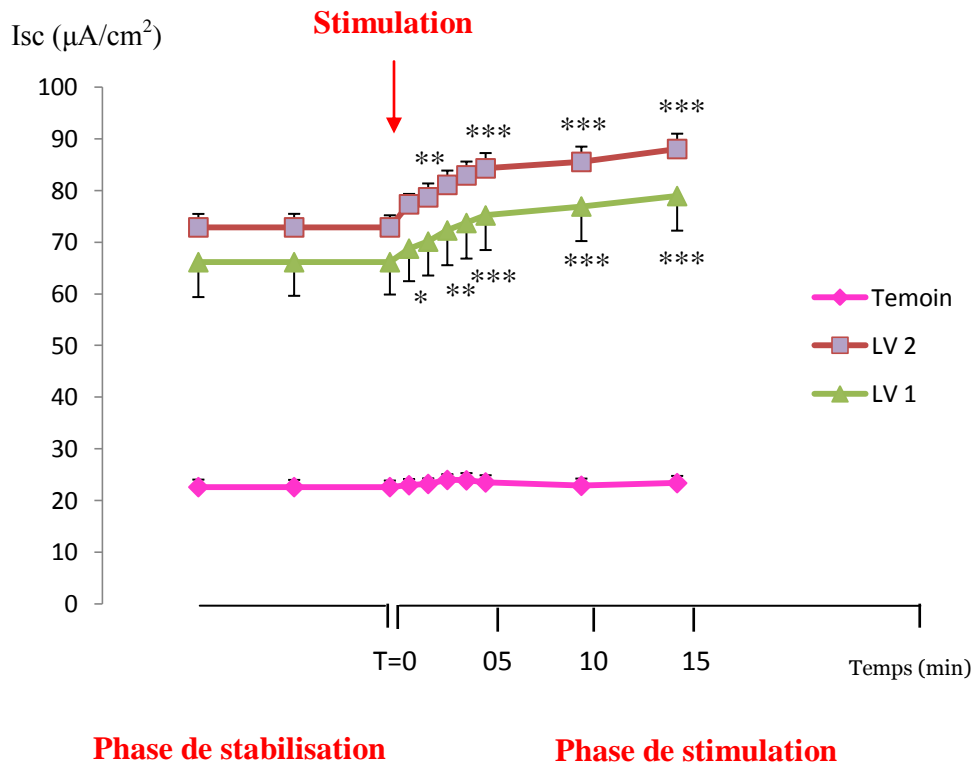


Figure 32. Effet du lait de vache sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, le lait de vache est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LV₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait de vache.

LV₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait de vache.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

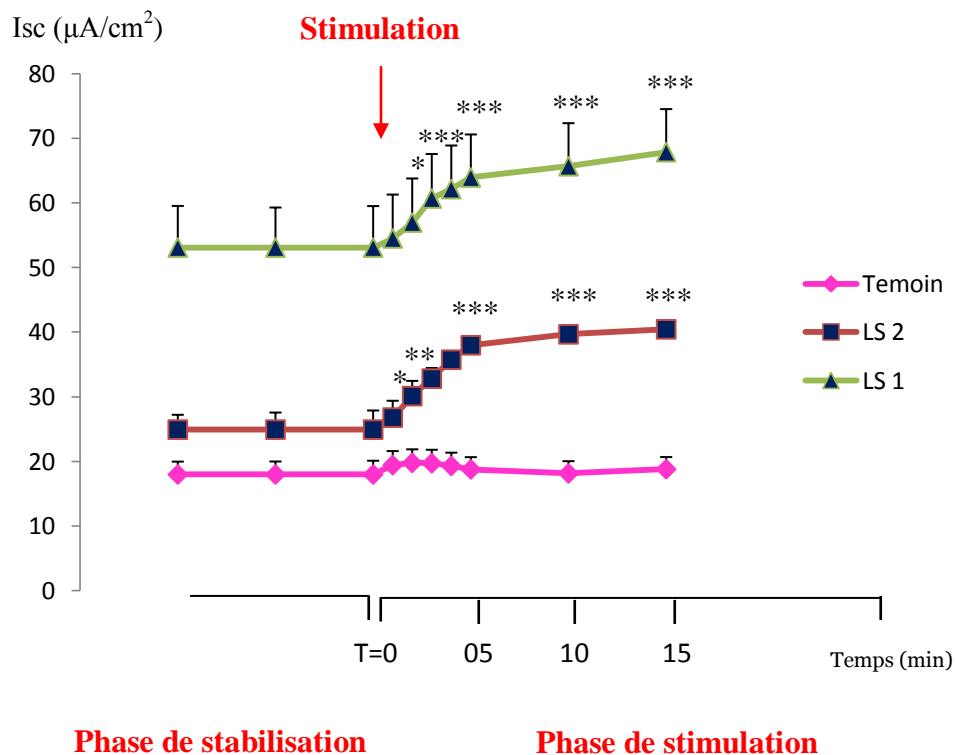


Figure 33. Effet du lait Standard sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, le lait standard est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LS₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait standard.

LS₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait standard.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

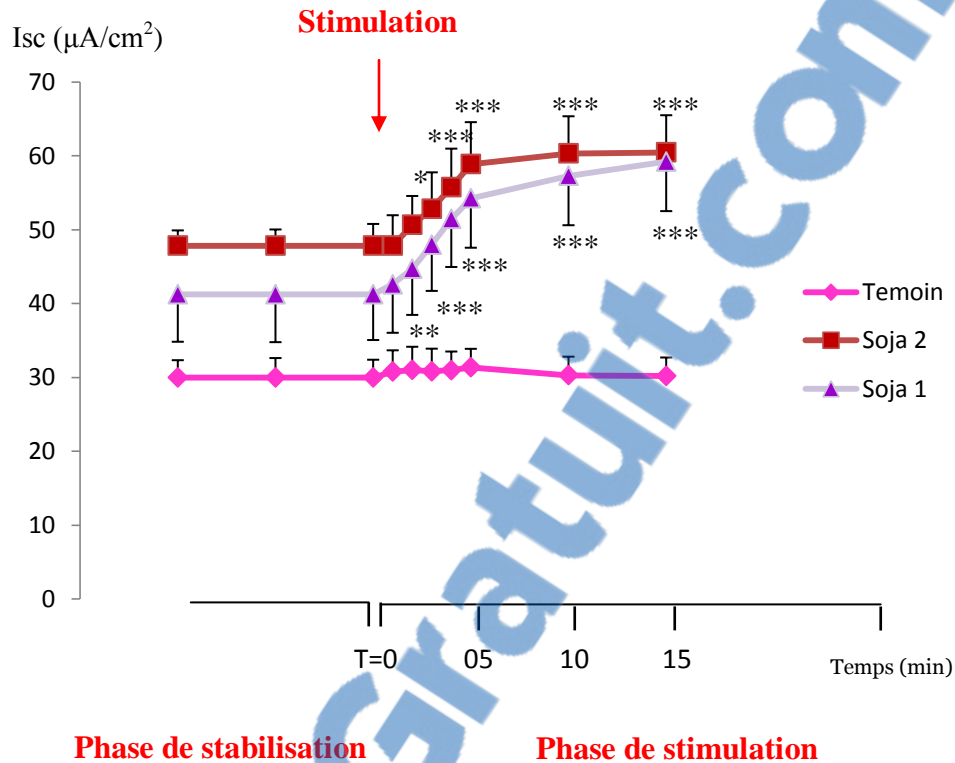


Figure 34. Effet de la formule à base de Soja sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, la formule à base de Soja est déposée dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

Soja₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Soja₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

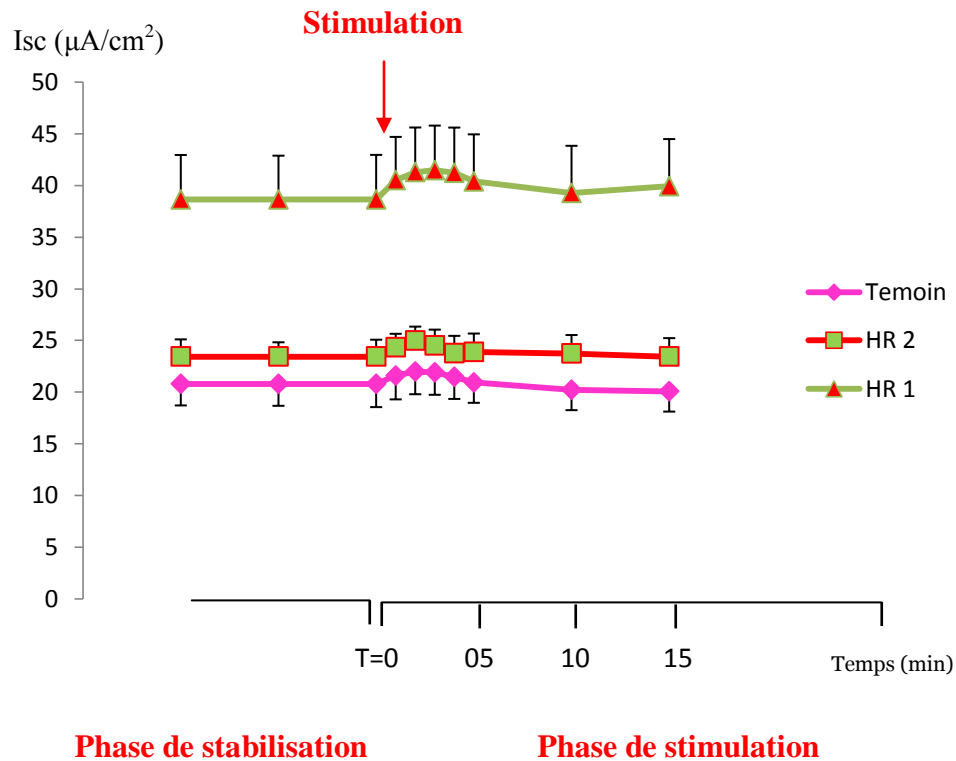


Figure 35. Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, la formule à base de riz hydrolysé est déposée dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

HR₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

HR₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Tableau 17. Effet des protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et du lait de vache ainsi que les laits infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) sur l'Isc des tissus de souris sensibilisées à la β -Lg ou l' α -La. Etude en chambre de Ussing.

		Isc (μ A/cm ²)					
		α -La (n=10)	β -Lg (n=10)	Lait de Vache (n=10)	Lait standard (n=10)	Soja (n=10)	Riz Hydrolysé (n=10)
Témoin	To	23,03 \pm 1,42	22,99 \pm 1,40	22,63 \pm 1,39	17,97 \pm 1,89	29,97 \pm 2,48	20,08 \pm 1,98
	T15	24,10 \pm 1,44	24,10 \pm 1,94	23,40 \pm 1,45	18,78 \pm 2,002	30,19 \pm 2,33	20,80 \pm 2,10
P		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sensibilisé à la β-Lg	To	40,88 \pm 5,34		66,15 \pm 6,68	53,11 \pm 6,66	41,25 \pm 6,72	38,63 \pm 4,55
	T15	56,10 \pm 5,12		78,95 \pm 6,74	67,87 \pm 6,43	59,22 \pm 6,44	39,92 \pm 4,29
P		p <0,001		p <0,001	p <0,001	p <0,001	NS
Sensibilisé à L' α-La	To	39,88 \pm 5,71		72,89 \pm 2,96	24,92 \pm 0,23	47,84 \pm 5,66	23,44 \pm 1,64
	T15	57,004 \pm 5,34		88,058 \pm 2,60	40,44 \pm 2,29	60,48 \pm 2,04	23,90 \pm 1,76
P		p <0,001		p <0,001	p <0,001	p <0,001	NS

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards recueillies au temps T₀ (valeurs du courant de base) au moment de la stimulation des tissus par les protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et par les différents laits infantiles et après 15 min de la stimulation.

NS : Non significatif.

n : nombre de tissus.

Tableau 18. Les valeurs de ΔI_{sc} (courant de court circuit) des tissus sensibilisés à la β -Lg et l' α -La stimulés avec les protéines sensibilisantes β -Lg, α -La, le lait de vache, les préparations infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) ainsi que celles des témoins.

ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)	
Souris témoins (n=10)	
β -Lg	1,11 \pm 0,55
α -La	1,47 \pm 0,22
Lait de vache	0,77 \pm 0,62
Lait Standard	0,81 \pm 0,28
Soja	0,22 \pm 0,21
Riz hydrolysé	0,72 \pm 0,30
Souris immunisées à la β-Lg (n=10)	
β -Lg	15,22 \pm 0,94
Lait de vache	12,8 \pm 0,99
Lait Standard	14,76 \pm 1,66
Soja	17,97 \pm 1,47
Riz hydrolysé	1,29 \pm 0,51
Souris immunisées à l'α-La (n=10)	
α -La	17,12 \pm 0,78
Lait de vache	15,16 \pm 0,57
Lait Standard	15,52 \pm 2,06
Soja	12,64 \pm 3,61
Riz hydrolysé	0,46 \pm 0,32

$$\Delta I_{sc} = I_{sc}(t_{15}) - I_{sc}(t_0)$$

T_0 : Temps avant la stimulation du tissu.

T_{15} : Après 15 minutes de stimulation.

4-8.3.2. Effet du lait de vache sur la conductance (G)

Nous avons mesuré les variations de la conductance (G) après stimulation des fragments jujénaux des souris sensibilisées à la β -Lg avec du lait de vache. Les valeurs de G augmentent de $24,43 \pm 2,89$ mmho/cm² à $31,43 \pm 2,91$ mmho/cm² ($p < 0,001$). Chez les souris immunisées à l' α -La et stimulées avec du lait de vache les valeurs de G augmentent de $23,33 \pm 2,97$ mmho/cm² à $31,16 \pm 2,90$ mmho/cm² ($p < 0,001$) (figure 44).

4-8.3.3. Effet des préparations infantiles (Standard, Soja, Riz hydrolysé) sur la conductance

Le dépôt du lait standard ou la formule à base de Soja dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés à la β -Lg provoque une augmentation très significative de la conductance. Pour la préparation standard, les valeurs de bases passent de $19,05 \pm 1,04$ mmho/cm² à $26,61 \pm 1,20$ mmho/cm² ($p < 0,001$), et de $22,40 \pm 2,23$ mmho/cm² à $32,61 \pm 1,51$ mmho/cm² ($p < 0,001$) pour la formule à base de Soja.

Une augmentation très significative de la conductance est observée après stimulation des tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La par la préparation standard et la formule à base de Soja. Les valeurs passent respectivement de $16,79 \pm 1,12$ mmho/cm² à $23,31 \pm 1,74$ mmho/cm² et de $26,41 \pm 6,47$ mmho/cm² à $36,14 \pm 8,13$ mmho/cm² ($p < 0,001$) (figure 45, figure 46). Cette augmentation de la conductance traduit probablement une altération de la barrière intestinale chez les animaux sensibilisés. En revanche, après stimulations des tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg et à l' α -La par la formule à base de riz hydrolysé les valeurs de la conductance restent stables durant l'expérience (figure 47). Pour les témoins aucune variation significative de ce paramètre n'a été enregistrée (tableau 19, tableau 20).

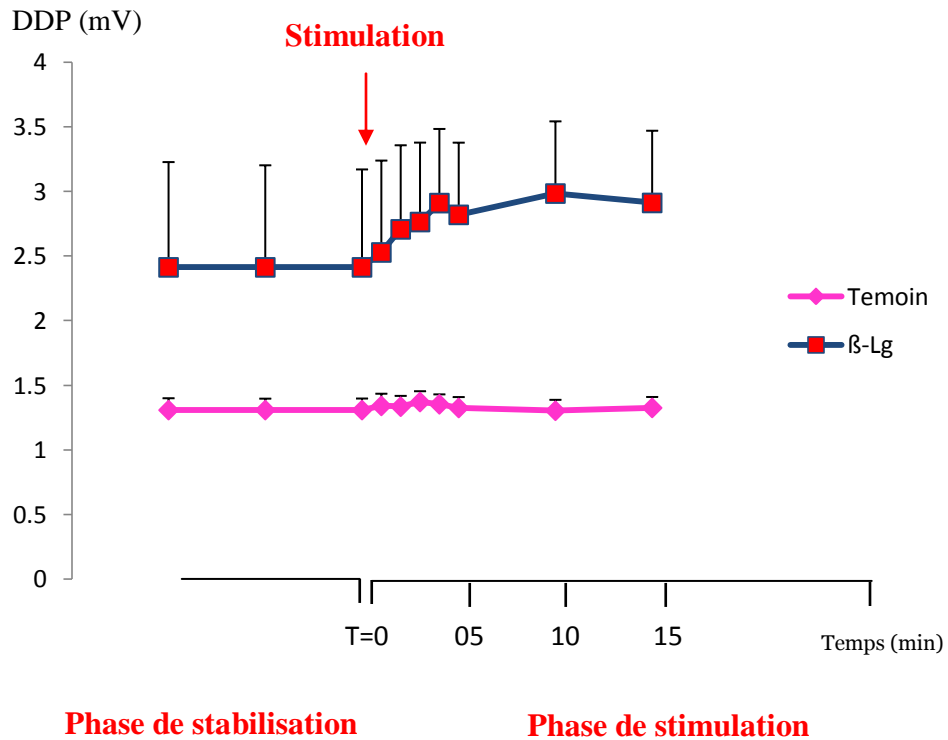


Figure 36. Effet de la β -Lg sur la différence de potentiel (DDP) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg.

Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t=0$, la protéine sensibilisante β -Lg est déposée dans le versant séreux à une concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

β -Lg (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux non sensibilisés.

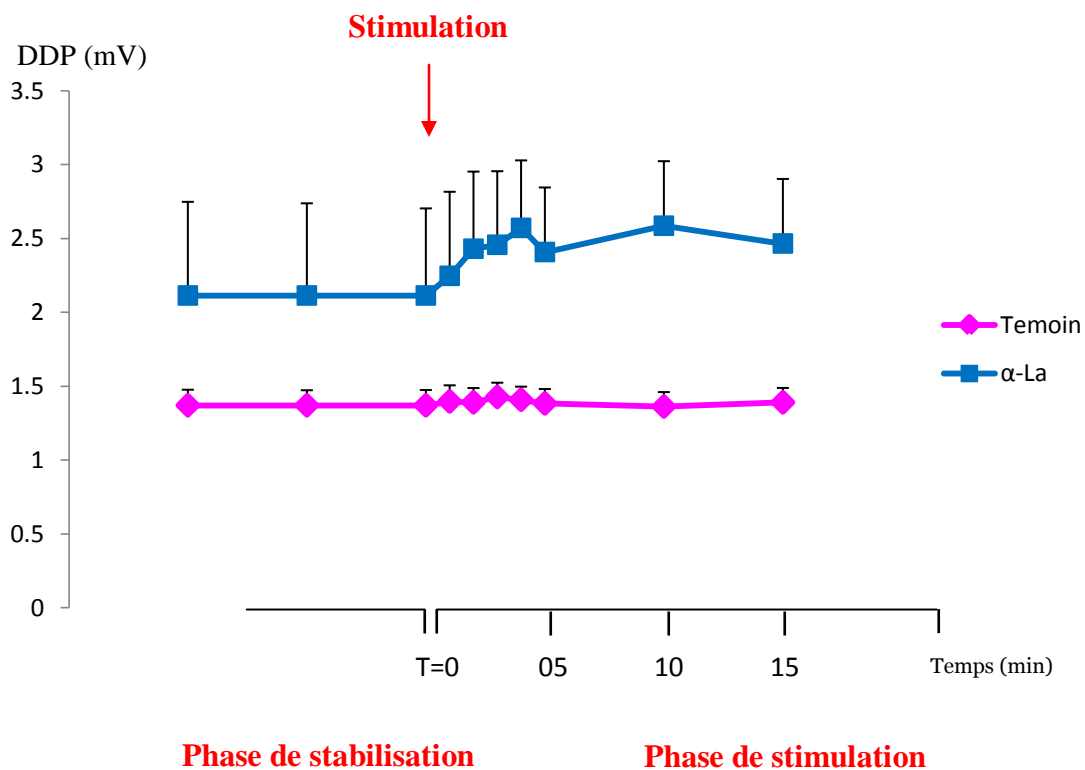


Figure 37. Effet de l' α -La sur la différence de potentiel (DDP) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La. Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes. A t=0, la protéine sensibilisante l' α -La est déposée dans le versant séreux à une concentration de 60 μ g/ml. Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards. α -La (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native. Témoins (n=10) : Tissus d'animaux non sensibilisés.

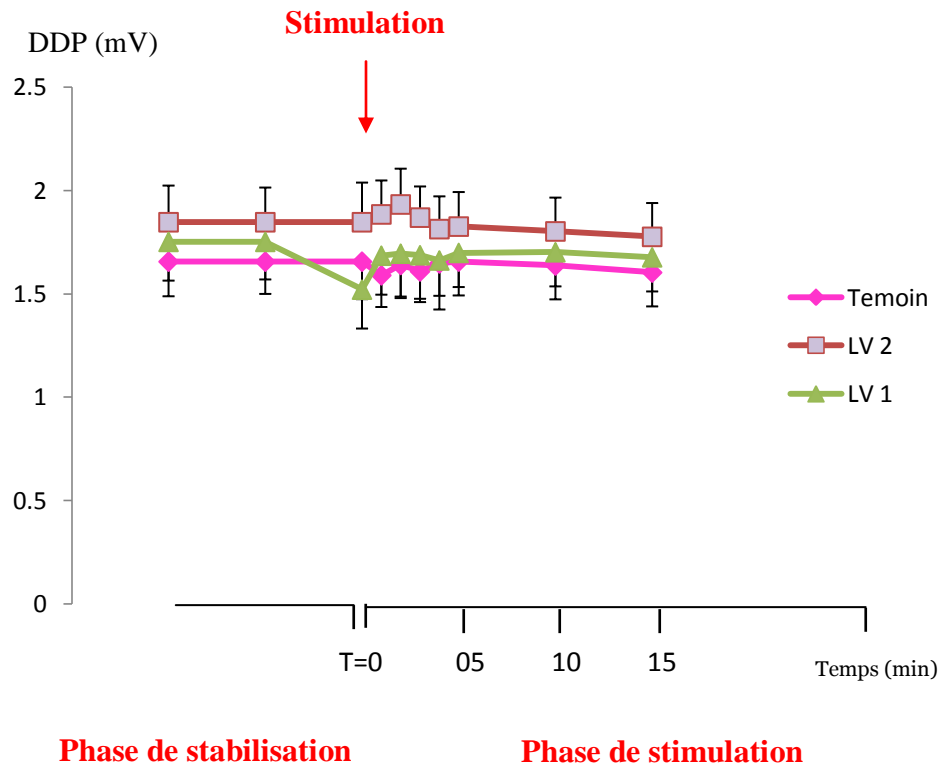


Figure 38. Effet du lait de vache sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, le lait de vache est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LV₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait de vache.

LV₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait de vache.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

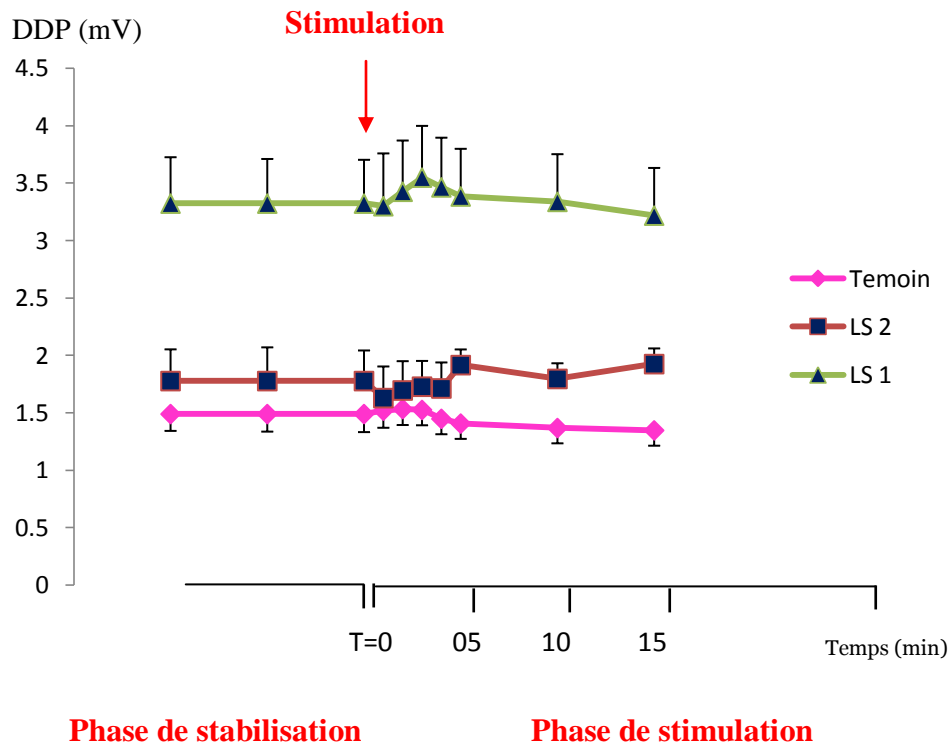


Figure 39. Effet du lait Standard sur la différence de potentiel (DDP) en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, le lait standard est déposé dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LS₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait standard.

LS₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait standard.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

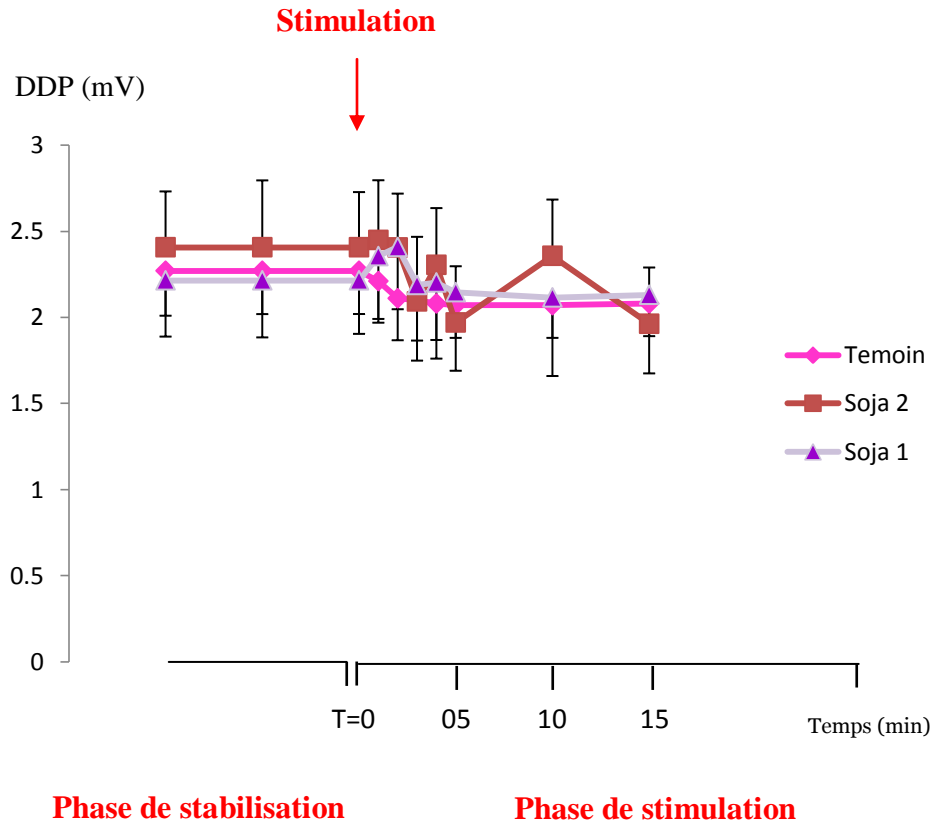


Figure 40. Effet de la formule à base de Soja sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, la formule à base de Soja est déposée dans le versant séreux à la concentration de 60 $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

Soja₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Soja₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

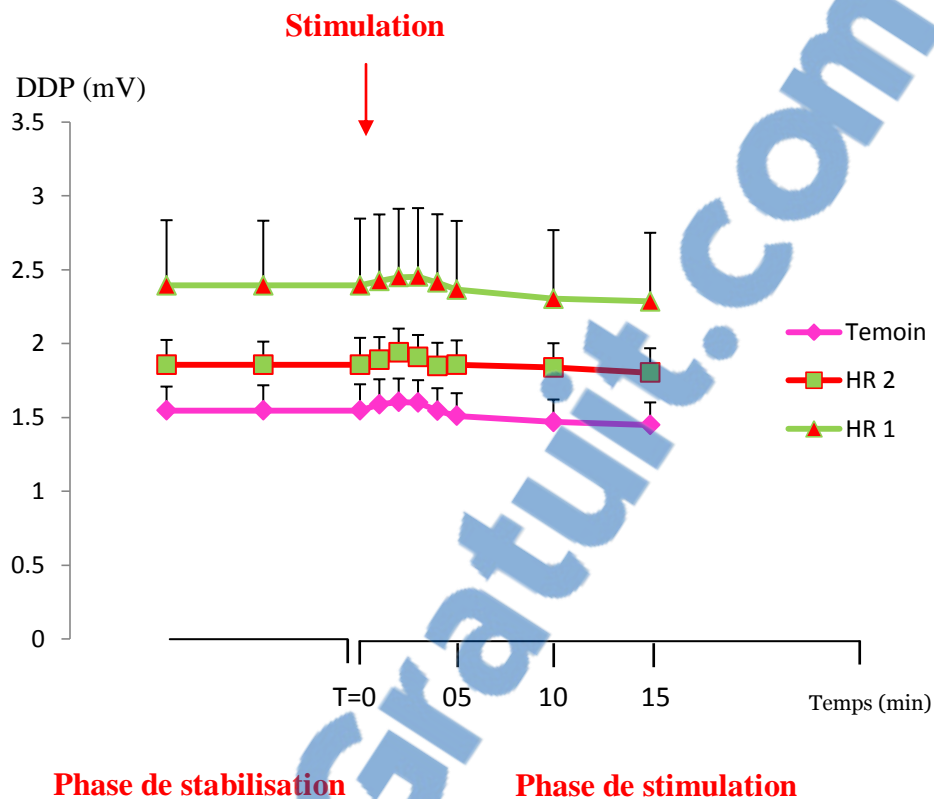


Figure 41. Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur la différence de potentiel (DDP) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de la DDP sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, la formule à base de riz hydrolysé est déposée dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

HR₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

HR₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

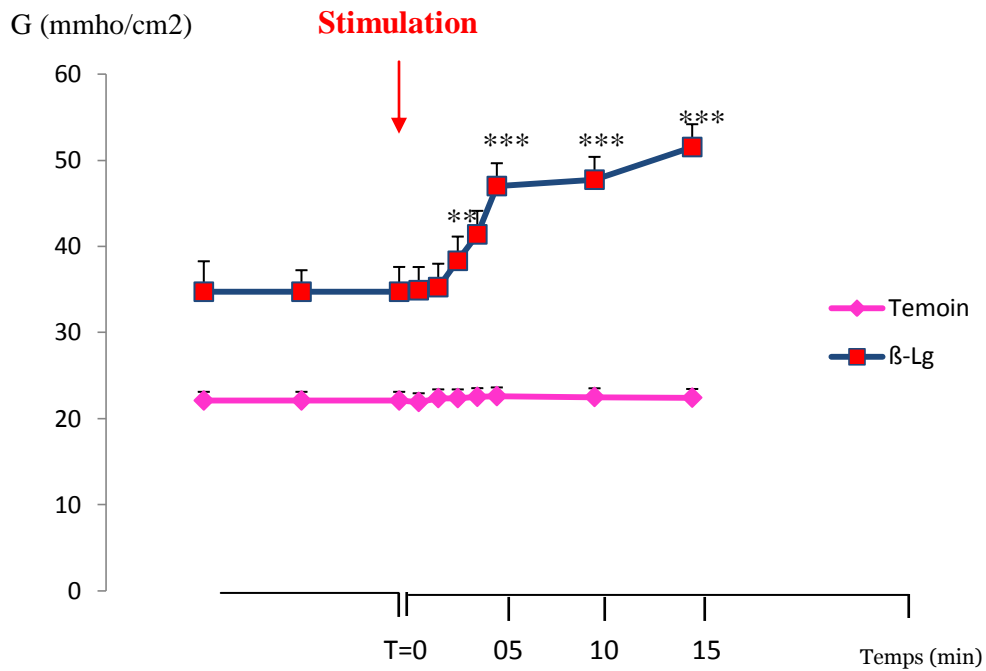
Tableau 19. Effet des protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et du lait de vache ainsi que les laits infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) sur la conductance (G) des tissus de souris sensibilisées à la β -Lg ou l' α -La. Etude en chambre de Ussing.

		G (mmho/cm²)					
		α-La (n=10)	β-Lg (n=10)	Lait de Vache (n=10)	Lait standard (n=10)	Soja (n=10)	Riz Hydrolysé (n=10)
Témoin	T₀	22,09 ± 2,01	21,89 ± 2,07	21,89 ± 1,91	15,16 ± 1,48	19,24 ± 1,11	16,40 ± 1,65
	T₁₅	22,42 ± 1,90	23,02 ± 1,75	22,92 ± 1,95	16,39 ± 1,32	19,68 ± 1,005	17,25 ± 1,51
P		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sensibilisé à la β-Lg	T₀	34,71 ± 2,64		24,43 ± 2,89	19,05 ± 1,04	22,40 ± 2,23	23,99 ± 3,54
	T₁₅	51,21 ± 3,53		31,43 ± 2,91	26,61 ± 1,20	32,61 ± 1,51	24,17 ± 3,46
P		p <0,001		p <0,001	p <0,001	p <0,001	NS
Sensibilisé à L' α-La	T₀	34,71 ± 2,64		23,33 ± 2,97	16,79 ± 1,12	26,41 ± 6,47	13,17 ± 0,74
	T₁₅	51,51 ± 3,37		31,16 ± 2,90	23,31 ± 1,74	36,14 ± 8,13	13,48 ± 0,89
P		p <0,001		p <0,001	p <0,001	p <0,001	NS

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards recueillies au temps T₀ (valeurs de G de base) au moment de la stimulation des tissus par les protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La) et par les différents laits infantiles et après 15 min de la stimulation.

NS : Non significatif.

n : nombre de tissus.



Phase de stabilisation

Phase de stimulation

Figure 42. Effet de la β -Lg sur la conductance (G) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg.

Avant stimulation, les valeurs de base de la G sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t=0$, la protéine sensibilisante β -Lg est déposée dans le versant séreux à une concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

β -Lg (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux non sensibilisés.

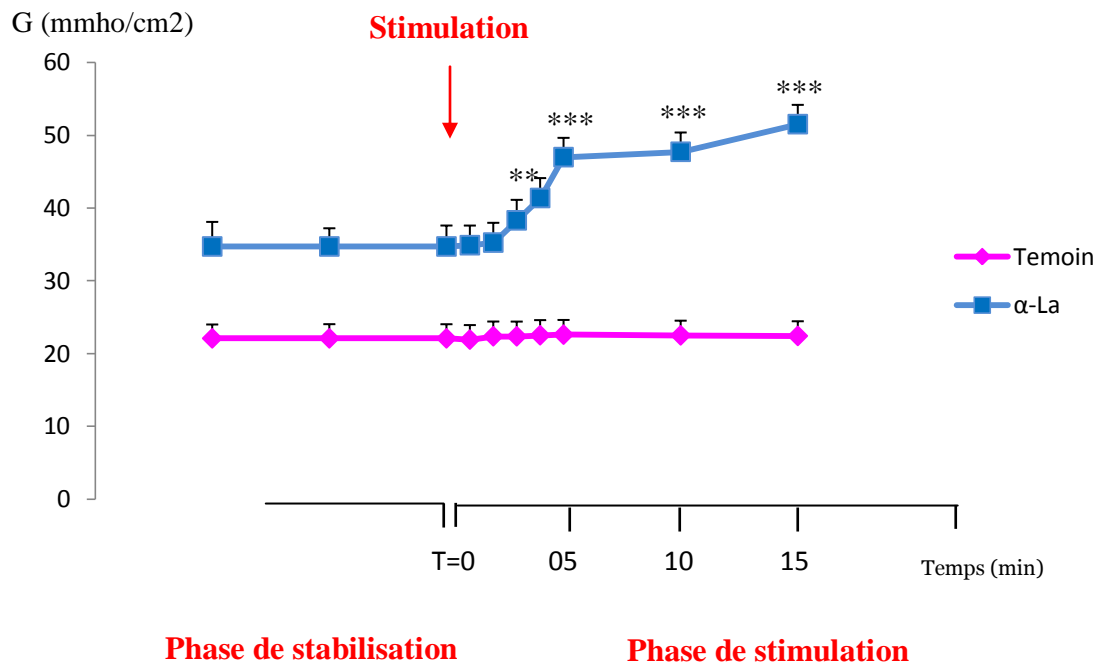


Figure 43. Effet de l' α -La sur la conductance (G) mesurée en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de G sont recueillies pendant 15 minutes.

A t=0, la protéine sensibilisante l' α -La est déposée dans le versant séreux à une concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

α -La (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux non sensibilisés.

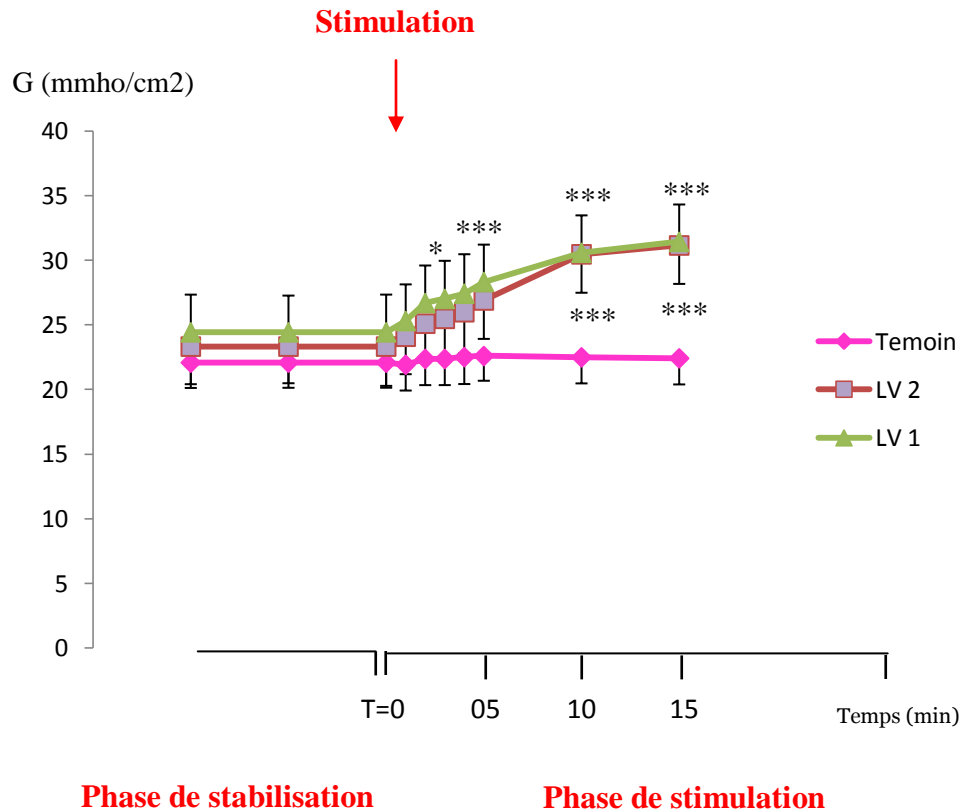


Figure 44. Effet du lait de vache sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de G sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, le lait de vache est déposé dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LV₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait de vache.

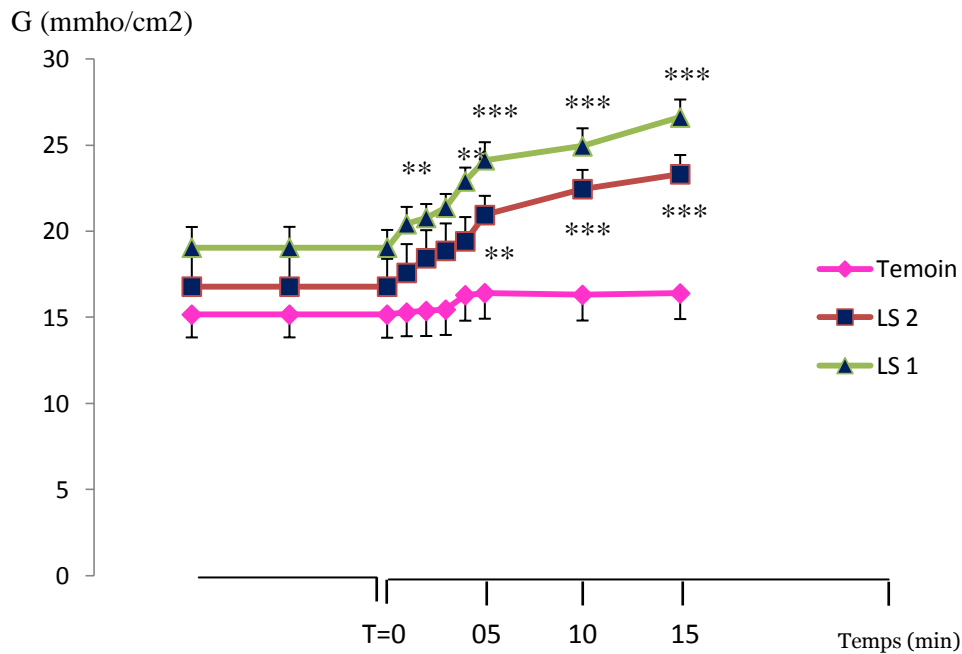
LV₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait de vache.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$



Phase de stabilisation

Phase de stimulation

Figure 45. Effet du lait Standard sur la conductance (G) en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de G sont recueillies pendant 15 minutes.

A t = 0, le lait standard est déposé dans le versant séreux à la concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

LS₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec du lait standard.

LS₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec du lait standard.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

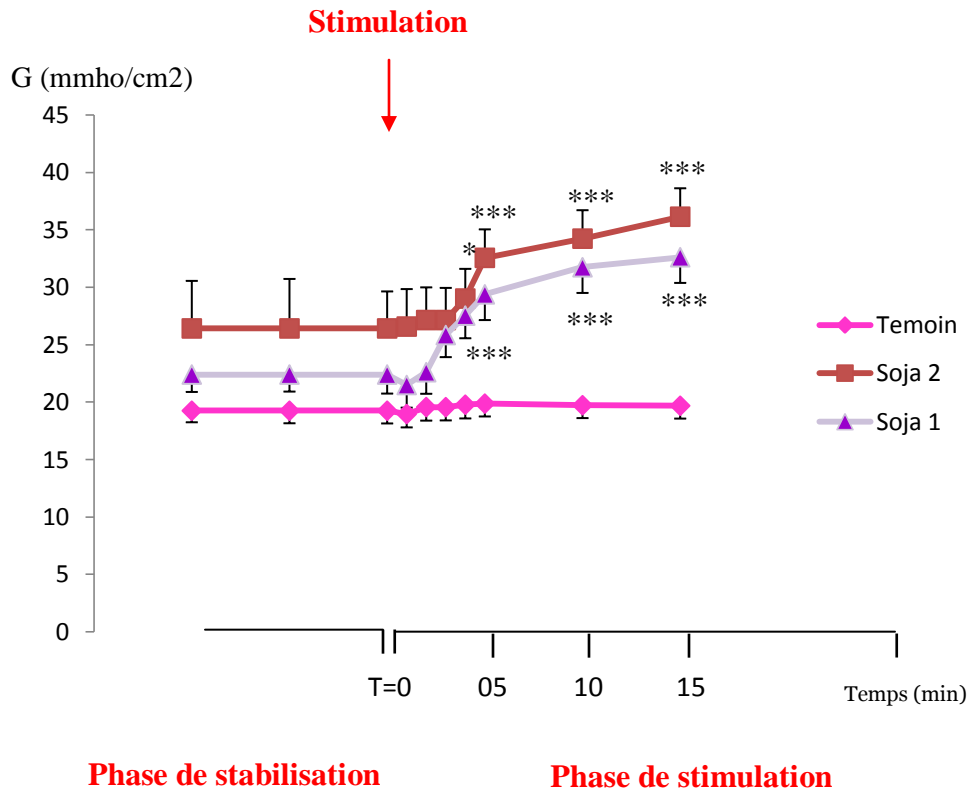


Figure 46. Effet de la formule à base de Soja sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de G sont recueillies pendant 15 minutes.

A t = 0, la formule à base de Soja est déposée dans le versant séreux à la concentration de 60 μ g/ml.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

Soja₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Soja₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de Soja.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,00

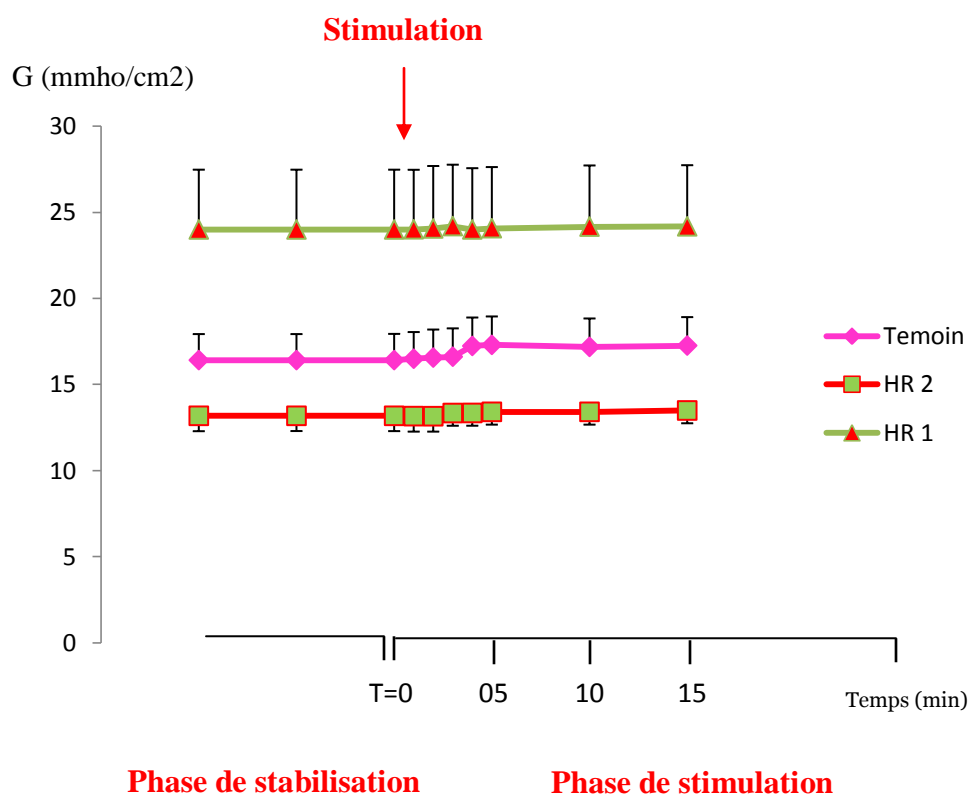


Figure 47. Effet de la formule à base de riz hydrolysé sur la conductance (G) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -Lg et α -La.

Avant stimulation, les valeurs de base de G sont recueillies pendant 15 minutes.

A $t = 0$, la formule à base de riz hydrolysé est déposée dans le versant séreux à la concentration de $60 \mu\text{g/ml}$.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

HR₁ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

HR₂ (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native et stimulés avec la formule à base de riz hydrolysé.

Témoins (n=10) : Tissus d'animaux témoins non sensibilisés.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Tableau 20. Les valeurs de ΔG (conductance) des tissus sensibilisés à la β -Lg et l' α -La stimulés avec les protéines sensibilisantes β -Lg, α -La, le lait de vache, les préparations infantiles (Standard, Soja, riz hydrolysé) ainsi que celles des témoins.

$\Delta G(\text{mmho}/\text{cm}^2)$	
Souris témoins (n=10)	
β -Lg	1,13 \pm 0,08
α -La	0,33 \pm 0,09
Lait de vache	1,03 \pm 0,09
Lait Standard	1,23 \pm 0,33
Soja	0,44 \pm 0,06
Riz hydrolysé	0,85 \pm 0,34
Souris immunisées à la β-Lg (n=10)	
β -Lg	16,5 \pm 1,49
Lait de vache	7 \pm 0,45
Lait Standard	7,56 \pm 1,12
Soja	10,21 \pm 1,17
Riz hydrolysé	0,18 \pm 0,16
Souris immunisées à l'α-La (n=10)	
α -La	16,80 \pm 1,32
Lait de vache	7,83 \pm 0,09
Lait Standard	6,52 \pm 0,99
Soja	9,73 \pm 1,77
Riz hydrolysé	0,31 \pm 0,16

$$\Delta G = G(t_{15}) - G(t_0)$$

T_0 : Temps avant la stimulation du tissu.

T_{15} : Après 15 minutes de stimulation.

4-8.4. Effet du furosémide

Nos précédents résultats montrent clairement que l'Isc et la conductance sont significativement modifiés lorsque les épithéliums des souris immunisées sont exposés aux antigènes sensibilisants. On considère que ces paramètres électriques, en particulier l'Isc, sont une mesure des mouvements ioniques à travers l'épithélium intestinal et leur modification traduit un changement dans le transport des électrolytes, principalement le Cl⁻ et le Na⁺.

Pour vérifier les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de l'activité sécrétoire de l'épithélium intestinal lorsque ce dernier est activé par l'antigène sensibilisant, nous avons testé l'action d'un diurétique, le furosémide. Cet agent est un inhibiteur spécifique du système de cotransport Cl/Na/K situé sur la membrane basolatérale. Le furosémide entraîne une déplétion de la cellule en Cl⁻ et donc une diminution de la sécrétion de Cl⁻.

Pour cela, nous avons monté des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β-Lg et α-La en chambre de Ussing et après stabilisation des paramètres électrophysiologiques de base, les tissus sont stimulés par du furosémide du côté séreux à la concentration de 5 x 10⁻² M., puis le courant est mesuré toutes les minutes pendant 5 minutes. Les tissus ont été stimulés par la suite avec les protéines sensibilisantes.

Les résultats ont montré que lorsque le furosémide (figure 48, figure 49) est ajouté dans le compartiment séreux, l'Isc ne varie pas et reste comparable avec les valeurs de base. Le dépôt de l'antigène sensibilisant dans le versant séreux ne produit aucune variation de l'Isc. Ces résultats impliquent que le courant de court circuit induit par l'antigène sensibilisant est bien un courant de chlore.

4-8.5. Effet du glucose

Pour vérifier l'intégrité structurale des fragments jéjunaux utilisés dans notre expérimentation, nous avons testé l'effet du glucose sur les versants muqueux et séreux de ces tissus à la fin des expériences. Le glucose a été déposé à la concentration de 50 mM (figure 48, 49). Les résultats montrent une augmentation très significative de l'Isc (p < 0,001). Ceci indique que les tissus sont bien conservés et gardent leur intégrité structurale et fonctionnelle. Et que le furosémide n'a pas un effet toxique et qu'il n'interfère pas avec le mécanisme d'action de glucose. Donc les processus de cotransport glucose-Na⁺ ainsi que l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase ne sont pas altérés.

4-8.6. Tests de provocation par voie intrapéritonéale à la β -Lg et α -La: signes cliniques

Dans cette partie du travail, nous recherchons l'existence d'éventuelles réponses cliniques suite aux tests de provocation réalisés sur les groupes de souris sensibilisés à la β -Lg et α -La. Nos résultats montrent que :

Dans le groupe témoin, il n'y a aucune manifestation de signes cliniques.

Le groupe des souris immunisées à l' α -La, montre une variation des manifestations cliniques (stade 3) après administration intrapéritonéale de l' α -La.

Le groupe des souris immunisées à la β -Lg, montre des signes cliniques (allant jusqu'au stade 4).

Les signes cliniques des stades observés sont représentés par des grattements et le frottement du nez et de la tête, gonflement autour des yeux, poils hérissés, baisse de l'activité physique avec augmentation des mouvements respiratoires, difficultés respiratoires et absence de l'activité physique. Aucun décès n'a été observé.

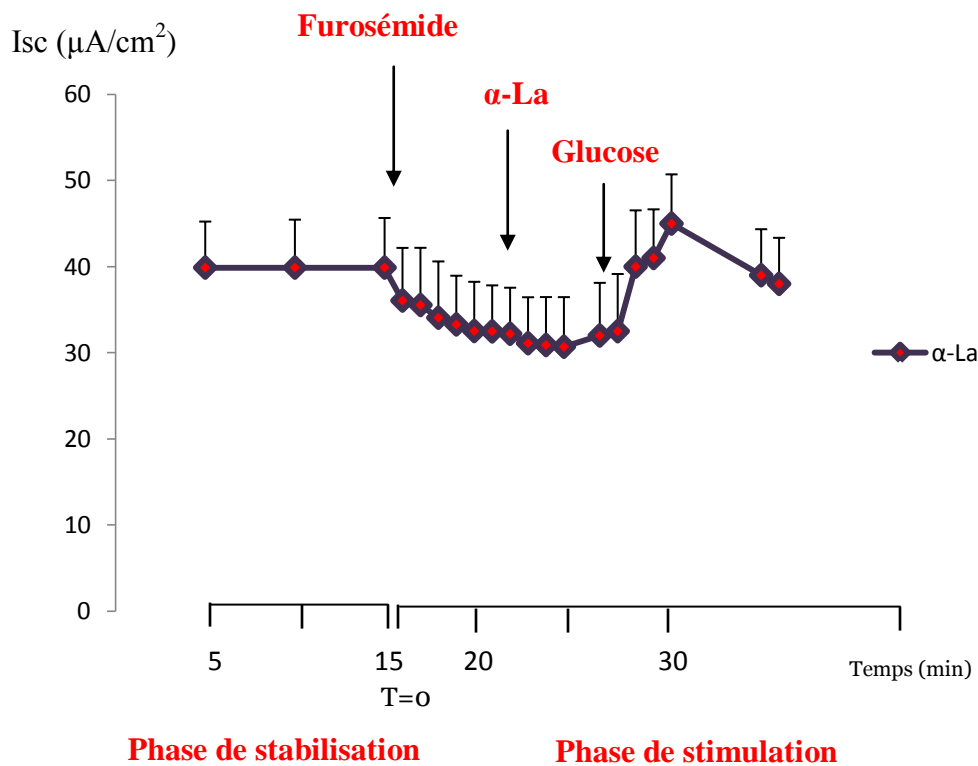


Figure 48. Effet de l' α -La sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à l' α -La préalablement incubé par le furosémide.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

l' α -La (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à l' α -La native, stimulés par le furosémide et l' α -La.

Le glucose est ajouté en fin de l'expérience à fin de vérifier l'intégrité des tissus.

On note une augmentation significative des valeurs de l'Isc des tissus sensibilisées à l' α -La après dépôt du glucose.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

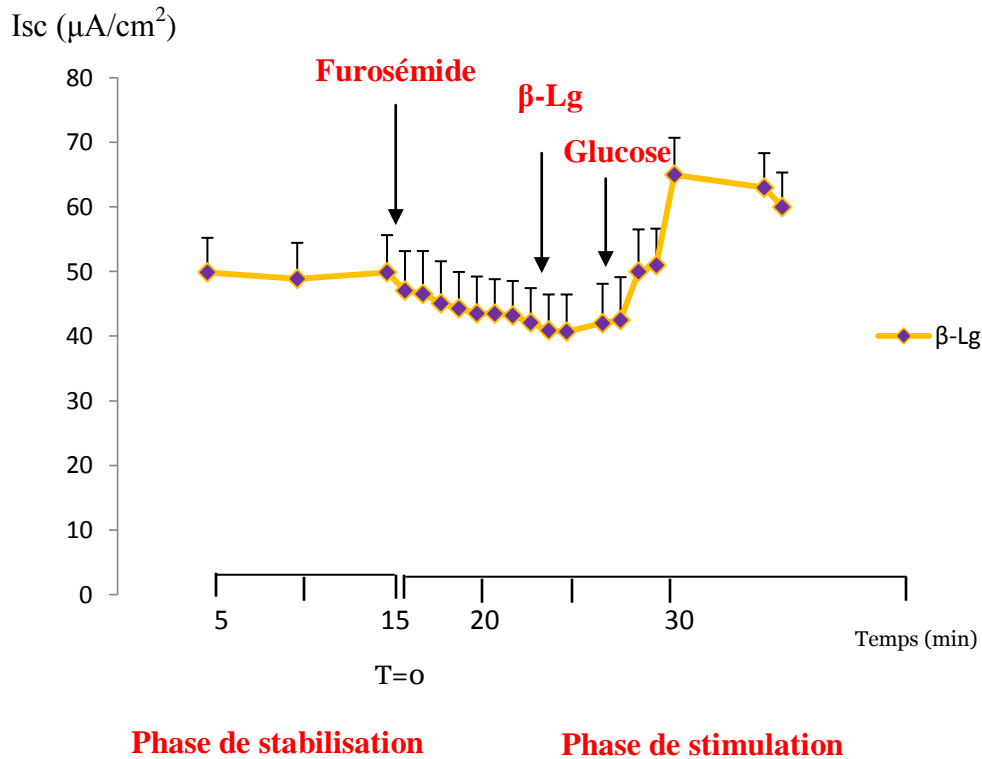


Figure 49. Effet de la β -Lg sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement incubé par le furosémide.

Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards.

β -Lg (n=10) : Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg native, stimulés par le furosémide et la β -Lg.

Le glucose est ajouté en fin de l'expérience à fin de vérifier l'intégrité des tissus.

On note une augmentation significative des valeurs de l'Isc des tissus sensibilisées à la β -Lg, après dépôt du glucose.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Discussion

5-Discussion

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est fréquente et touche 2 à 3 % des nourrissons. Elle est définie par une réaction immunologique vis-à-vis d'une ou plusieurs protéines du lait. C'est une réaction d'hypersensibilité immédiate médiée par les IgE mais elle peut également faire intervenir d'autres classes d'anticorps et/ou des mécanismes cellulaires (De Boissieu, 2013).

Le statut nutritionnel chez les enfants présentant une APLV s'améliore au fur et à mesure de l'histoire de la maladie sous régime d'exclusion et substitution (Baret et al., 2013). Le traitement consiste à remplacer les préparations pour nourrissons, le lait de vache et les laitages par des substituts du lait, jusqu'à une période récente, les seuls substituts du lait de vache se limitaient aux hydrolysats extensifs de PLV et aux préparations à base d'acides aminés (Bhatia et Greer, 2008). Mais les peptides de faible poids moléculaire des laits extensivement hydrolysés, semblent toujours conserver un potentiel allergisant (Brahim et al., 2012).

L'utilisation de préparations à base de protéines de soja étant déconseillée en raison de leur teneur en phytoestrogènes (Bocquet et al., 2001; Klemola et al., 2002; Agostoni et al., 2006; Comité de nutrition, 2006; Bhatia et Greer, 2008; Ponvert, 2009).

De nouvelles données ont récemment conduit à modifier la prise en charge des enfants ayant une allergie aux protéines du lait de vache (APLV), des préparations à base de protéines de riz hydrolysées ont été développées avec une composition conforme à la directive de 2006 (Commission des communautés européennes, 2006). Ces préparations sont constituées d'hydrolysats de protéines de riz HPR enrichi en lysine et thréonine pour obtenir un profil d'acides aminés similaire à celui des protéines animales. L'HPR sont conforme à la réglementation européenne des aliments diététiques à des fins médicale et permettent de couvrir les besoins nutritionnels des nourrissons, en plus la qualité gustative des préparations à base de protéines de riz est supérieure à celle des autres hydrolysats (Girardet, 2010).

Le riz est en effet une céréale peu allergisante et naturellement dépourvue de phytoestrogènes (Koo et Lasekan, 2007). Elle est bien adaptée à ces indications, sous réserve de compléter sa fraction protéique en lysine, thréonine et tryptophane, pour obtenir un

aminogramme conforme à celui du lait maternel qui constitue la protéine de référence (Commission des communautés européennes, 2006). Au cours de ces dernières années ces hydrolysats à base de protéines de riz ont été commercialisés. Cependant, aucune étude n'a confirmé leurs efficacités (Girardet, 2010). Les recommandations du DRACMA (Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy) restent prudentes sur l'utilisation des formules hydrolysées de riz pour les réserver en alternative aux hydrolysats de PLV dans certaines situations, mais certainement pas en alternative aux acides aminés de synthèse (Fiocchi et al., 2010). C'est la raison pour laquelle ce travail a été entrepris, afin de contrôler les propriétés immunologiques d'une formule commercialisée à base de riz hydrolysé (Modilac Expert Riz[®]), étudier les caractéristiques biochimiques de cette formule infantile. Déterminer leur antigénicité par une méthode immunoenzymatique, à l'aide d'un modèle animal (souris Balb/c) rendu allergique aux protéines du lait de vache (α -La, β -Lg). Déterminer l'effet de cette formule sur l'aspect histologique de l'intestin des souris Balb/c immunisées à la (β -Lg, α -La) nourries avec cet hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours. Déterminer l'allergénicité de cette formule en chambre de Ussing, par des tests de provocation effectués sur des fragments jéjunaux de souris Balb/c sensibilisées par voie parentérale à la (α -La, β -Lg). En comparant les résultats obtenus avec ceux obtenus avec les protéines sensibilisantes (α -La, β -Lg), le lait de vache et les différents laits infantiles (Standard, Soja).

Dans la première partie de notre travail nous avons fait une approche sur la caractérisation biochimique des protéines de la formule infantile commercialisée à base d'hydrolysate de protéines de riz (Modilac Expert Riz[®]). Après le dosage protéique de l'échantillon, les résultats obtenus concordent avec ceux mentionnés sur l'étiquetage par l'industrie, et sa teneur en protéines est proche de la concentration protéique du lait maternel comprise entre 12 à 14 g/l. Cette concentration est nettement inférieure à celle des autres mammifères (Turck, 2005) et elle est adaptée aux besoins du nourrisson. La teneur en protéines du lait de vache concorde avec la littérature (Vilain, 2010).

Dans notre travail, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée afin de s'assurer de la présence des principales protéines du lait de vache et vérifier s'il existe des protéines intactes dans la préparation à base de protéines de riz hydrolysées. L'analyse des

protéines du lait de vache par électrophorèse a permis d'identifier des bandes similaires à celles des protéines Kit marqueurs (Caséine, SAB, β -Lg, α -La). Alors qu'aucune bande n'est détectée dans le profil électrophorétique de la préparation protéique à base de riz.

Nos résultats confirment la littérature car la préparation ne contient pas des protéines intactes afin de réduire le potentiel antigénique ainsi que l'allergénique de la formule. Les changements dans l'activité allergénique pendant la production alimentaire contribuent à l'inactivation ou la destruction des structures d'épitopes, formation de nouveaux épitopes, ou l'amélioration de l'accès à des épitopes cachés. Le potentiel allergénique de la nourriture peut être modifié par plusieurs procédés de fabrication de produits alimentaires, tels que mécanique, la purification, les procédés thermiques, biochimiques et chimiques (Angelika et Matthias, 2002).

Dans la seconde partie de notre travail nous avons évalué les conséquences de la consommation d'un hydrolysate de protéines de riz sur l'évolution du poids corporel chez des souris immunisées à la β -Lg et l' α -La ayant ensuite consommé de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours.

Nos résultats montrent une augmentation progressive du poids corporel chez les deux groupes expérimentaux. Cependant, une diminution de l'évolution du poids corporel par rapport aux souris témoins a été notée dès la 6^{ème} semaine ce qui est probablement dû au fait que la formule infantile est déficiente en acides aminés essentiels. Nos résultats concordent avec les travaux de Patrick et Françoise, (2011) qui ont trouvé que les carences entraînées par la consommation de ces substituts à base de végétaux sont majeures. La plupart d'entre eux se caractérisent notamment par des teneurs trop faibles en calcium, fer, vitamines D et B12. Ils sont également souvent peu énergétiques conduisant ainsi, en plus des carences micronutritionnelles qu'ils provoquent, à un retard de croissance (Dupont et Boissieu, 2005).

Selon Ballmer et al., (2001) le paramètre unique le plus important pour le diagnostic d'une malnutrition protéique est assurément la perte de poids. La malnutrition protéique est la conséquence d'une insuffisance d'apport alimentaire et ou d'un besoin énergétique accru, ceci est en relation avec une perte de masse musculaire (Johansen et al., 2000). Plusieurs études ont confirmé l'impact d'un régime déficient en protéine sur la croissance pondérale (Crenn, 2001;

Jacotot, 2003). Fontenla et al., (2007) ont montré que la malnutrition protéique provoque la perte du poids sur une période de 28 jours.

Certains chercheurs trouvent que la composition des boissons végétales n'est pas adaptée aux besoins des nourrissons et enfants en bas âge et elles représentent un danger majeur (Elbez, 2006). Au cours des 20 dernières années, plusieurs cas de syndrome de Kwashiorkor concernent des nourrissons alimentés par des boissons à base de riz (Massa et al., 2001; Liu et al., 2001). D'après Mehr et al., (2009) le riz est allergénique et il est souvent impliqué dans l'apparition du syndrome de l'entérocolite chez les nourrissons australiens. Les différents « jus » de riz, d'amande, de coco ou de châtaigne, improprement appelés « laits », sont totalement inadaptés d'un point de vue nutritionnel aux besoins du nourrisson et doivent donc être formellement proscrits. Des désordres nutritionnels graves, rachitisme carenciel (Fox et al., 2004 ; Yu et al., 2006), ont été décrits chez des nourrissons ayant une APLV soumis à ces régimes d'exclusion aberrants.

Une autre étude italienne contrôlée a évalué la croissance de 58 nourrissons allergiques aux PLV, recevant soit, une préparation à base de soja, soit un hydrolysate extensif de PLV, soit un HPR. Les résultats ont été comparés aux valeurs d'un groupe témoin constitué de 30 enfants non allergiques recevant une alimentation libre. Les enfants étaient âgés en moyenne de trois mois à l'inclusion et ont été suivis pendant deux ans. Il n'a pas été observé de différence de croissance pondérale entre les trois groupes d'enfants allergiques. Cependant, des valeurs faiblement mais significativement plus basses ont été observées de façon transitoire, entre neuf et 18 mois dans le groupe HPR par rapport au groupe témoin dont les apports n'étaient toutefois pas documentés de façon précise (Savino et al., 2005).

Une étude a évalué la qualité nutritionnelle des HPR chez des enfants sains, non allergiques. Cette étude randomisée a été effectuée chez 65 nourrissons alimentés pendant quatre mois avec, soit un HPR, soit une préparation pour nourrisson standard. La croissance staturo-pondérale était identique dans les deux groupes de même que les concentrations plasmatiques de protéines totales, d'albumine, de préalbumine, de calcium, de magnésium et de phosphatases alcalines. L'hydrolysate de riz induisait des valeurs plasmatiques plus faibles de phosphore,

d'azote uréique, d'acides aminés (sauf pour la thréonine, plus élevée) et du rapport acides aminés essentiels+semi-essentiels/non essentiels (Lasekan et al., 2006).

En revanche, une étude multicentrique analogue, réalisée chez 93 nourrissons allergiques aux PLV suivis entre six et 12 mois, n'a pas montré de différences pour les valeurs des Z-scores du poids pour l'âge, de la taille pour l'âge, et du poids pour la taille entre les enfants nourris avec un HPR, nourris avec un hydrolysat extensif de PLV ou nourris avec une préparation à base de protéines de soja. Dans ces trois groupes, la croissance était également identique avec celle d'un groupe témoin constitué d'enfants restés allaités (Agostoni et al., 2007).

Une préparation infantile étudiée à base d'HPR a permis une croissance normale chez des nourrissons sains à risque allergique ou présentant des troubles digestifs mineurs. Sa tolérance et son acceptabilité ont été bonnes (Girardet et al., 2013).

Des études ont été effectuées sur des groupes d'enfants afin d'évaluer l'efficacité nutritionnelle des hydrolysats de riz, différents groupes d'enfants allergiques aux PLV reçoivent soit une préparation à base de riz, ou de soja et ont été comparés avec un groupe témoin formé d'enfants non allergiques recevant une alimentation libre. Ces groupes d'enfants âgés moyennement de 3 mois ont été suivi pendant 2 ans, les résultats ont montré que la croissance pondérale des différents groupes était similaire et il n'y a pas eu de différence significative observée (D'Auria et al., 2003). Une étude analogue était réalisée par Agostini et al., (2006) utilisant l'hydrolysat de PLV, de protéines de riz, et de protéines de soja, le groupe témoin était formé par des enfants allaités au sein, les résultats ne montrent aucune différence de croissance pondérale entre les groupes qui recevaient l'hydrolysat de PLV, et ceux qui recevaient l'hydrolysat de protéines de riz et ceux de l'hydrolysat de protéines de soja comparé au groupe témoin.

Une étude espagnole récente, randomisée a confirmé, chez 92 nourrissons ayant une allergie IgE médiée aux PLV, que la consommation d'un HPR permettait une croissance normale, identique à celle obtenue avec un hydrolysat extensif de PLV (Reche et al., 2010).

Un essai randomisé ouvert a comparé un eHF de riz enrichi en lysine, thréonine et tryptophane à un eHF de caséines chez 81 nourrissons de 4 mois d'âge moyen présentant une APLV. Les nourrissons qui avaient à l'inclusion un poids inférieur à la moyenne, probablement en raison de l'APLV, avaient normalisé leur poids (50e percentile) à l'âge de 12 mois avec l'eHF de riz et à l'âge de 18 mois avec l'eHF de caséine. La taille moyenne des nourrissons alimentés avec l'eHF de riz est restée au 50e percentile de l'inclusion jusqu'à la fin des 2 années d'étude. Les différences de croissance en taille et en poids entre les régimes suivis, allaitement ou hydrolysats, ont été bien analysées au sein de l'étude GINI (German infant nutritional intervention study), (Rzehak et al., 2009). L'alimentation avec un eHF de caséine induit une réduction transitoire de la croissance pondérale au cours de la 1re année de vie, sans conséquence à long terme sur l'indice de masse corporelle (IMC) (Rzehak et al., 2009).

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons mesuré l'antigénicité de la formule infantile à base de protéines de riz hydrolysées par une méthode immunoenzymatique, à l'aide d'un model animal (souris Balb/c) rendu allergique aux protéines du lait de vache (α -La, β -Lg). Pour cela, nous avons utilisé des anticorps sériques de type IgG dirigés contre la β -Lg et l' α -La, obtenus en utilisant la voie de sensibilisation parentérale.

La voie intrapéritonéale a été choisie en présence d'hydroxyde d'aluminium comme voie de sensibilisation, car elle est facile à utiliser et permet d'introduire l'antigène directement au niveau systémique. Elle est efficace, optimise les réponses immunitaires et entraîne une production importante des IgE spécifiques (Dearman et al, 2003).

Le développement de modèle animal, capable de produire des IgE ayant la même spécificité que les IgE humaines et développant des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez les patients allergiques, présente un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de l'allergie alimentaire. Du fait des connaissances accumulées sur la génétique et l'immunologie chez la souris, cette espèce animale a souvent été utilisée pour réaliser ce type d'études (Adel-Patient et al., 2005; Mine et Yang, 2007). Par leurs caractéristiques, différentes souches de souris sont particulièrement utilisées en allergie, ainsi que différentes voies de sensibilisation expérimentales (Bodinier et al., 2008). La souris Balb/c est une souche forte productrice d'IgE, mimant ainsi le phénotype atopique

humain, qui s'avère très intéressante pour étudier la phase de sensibilisation aux allergènes (Dearman, 2001), mais également la phase de déclenchement de la réaction allergique (Adel-Patient et al., 2003).

Pour la mise en place de notre modèle animal, nous avons suivi le protocole déjà mis au point par Négauoui et al., (2007); Zellal et al., (2009), et qui permet d'immuniser des souris femelles de souches Balb/c à la β -Lg et à l' α -La par voie intra péritonéale et en présence d'alun (adjuvant). Sur ce modèle nous avons dosé les titres sériques en anticorps IgG spécifiques à la β -Lg et à l' α -La, également des anticorps impliqués dans l'hypersensibilité : Ig E par la méthode Elisa, afin de nous assurer de la réponse immune systémique développée chez ces dernières.

Nos résultats montrent bien le développement d'une hypersensibilité contre l'antigène administré la β -Lg et l' α -La par une réponse immunitaire d'IgG anti β -Lg et d'IgG anti α -La élevée et par un taux important d'IgE anti β -Lg et d'IgE anti α -La retrouvés dans les sérums des souris Balb/c. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Frossard et al., (2004) qui ont observé chez des souris anaphylactiques immunisées à la β -Lg, une forte augmentation des titres en anticorps sériques IgG₁ et IgE anti β -Lg ainsi qu'une augmentation dans la production d'IL₄, traduisant une réponse immunitaire de prédominance Th₂.

Nos résultats sont également en accord avec ceux de la littérature, qui montrent que l'administration par voie parentérale des protéines du lait de vache aux animaux, induit une production d'anticorps de type IgG (Knippels et al., 2000). Nos résultats concordent avec les travaux effectués sur ce sujet et qui montrent que l'hydroxyde d'aluminium induit chez les souris immunisées aux protéines du lait de vache une hyper immunisation systémique et que la souris Balb/c est un bon modèle d'allergie et d'étude sur les mécanismes d'immunopathologie (Adel et al., 2003).

L'antigénicité d'une protéine n'est pas systématiquement associée à l'intégrité de sa structure native. Les traitements thermiques, en altérant la structure d'une protéine, peuvent modifier le potentiel antigénique, laisser ce potentiel intact, ou bien faire apparaître de nouveaux épitopes allergéniques. L'existence d'épitopes séquentiels et conformationnels, le démasquage

de nouveaux épitopes, ou la modification d'épitopes expliquent la difficulté d'anticiper et de généraliser les effets de modifications dues à des traitements sur l'allergénicité (Davis et al., 2001 ; Sanchez et Frémont, 2003 ; Moudoulet, 2005 ; Sathe et al., 2005).

L'antigénicité englobe à la fois la capacité à être reconnue et se lier à des anticorps spécifiques en majorité de la classe IgG (Wal, 2001). Pour cela, la mesure de la réactivité de la formule infantile à base d'hydrolysat de protéines de riz, est étudiée vis-à-vis des anticorps de type IgG anti β -Lg et anti α -La.

L'étude de la réactivité montre une diminution fortement significative de l'antigénicité des protéines du lait de vache après un régime à base de protéines de riz hydrolysées, et aucune réaction n'a été détectée avec l'hydrolysat de protéines de riz que ce soit avant ou après le régime. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Giorgio et al., (2003) qui ont mené une expérience sur des cobayes immunisés avec les protéines du lait de vache et nourris avec une formule d'hydrolysat de riz, les anticorps IgG spécifiques ont été mesurés par l'enzyme-linked immunosorbent assay. Aucune réaction n'a été observée vis-à-vis cette formule.

Une autre étude prospective de tolérance d'un hydrolysat de riz enrichi en lysine et thréonine a inclus 99 enfants allergiques aux PLV âgés en moyenne de 3 ans (Fiocchi et al., 2006). Les patients avaient souvent des IgE sériques anti-protéines de riz dans leur sérum, mais seuls 6 d'entre eux ont présenté des réactions à cet hydrolysat, ce qui rend la préparation utilisable chez les enfants souffrant d'APLV (Viola, 2012).

La quatrième partie de notre travail nous a permis de déterminer l'effet de la formule à base de protéines de riz hydrolysées sur l'aspect histologique de l'intestin des souris nourries avec cette formule pendant 28 jours après immunisation avec la β -Lg ou α -La.

Lorsque l'enfant présente des symptômes digestifs chroniques, la recherche d'éosinophiles dans la muqueuse digestive doit être demandée systématiquement si une endoscopie digestive est effectuée, avec comptage des éosinophiles. L'analyse morphométrique des biopsies de l'intestin grêle est également importante, à la recherche notamment d'une atrophie villositaire (Dupont, 2012).

L'étude histologique réalisée dans ce travail a indiqué sur le plan fonctionnel, que la muqueuse intestinale des souris témoins positifs subit d'importantes modifications dont une diminution significative de la hauteur villositaire à l'origine d'une atrophie partielle. Sur le plan immunitaire, les résultats montrent une importante infiltration lymphocytaire intra épithéliale suggérant une réponse humorale locale. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Addou et al., (2004); Kalamoun et al., (2010). Des manifestations similaires sont observées au cours de l'anaphylaxie due aux antigènes alimentaires (Levine et Saltzman, 1998; Sakamoto et al., 1998). Nos résultats suggèrent donc une intervention probable des éléments du système immunitaire associe au tube digestif. Dans la littérature, il a été rapporté qu'il existait un nombre élevé de lymphocytes intra-épithéliaux dans l'intestin grêle des enfants intolérants aux protéines du lait de vache significativement augmenté par rapport aux témoins qui ne présentent pas d'allergie (Phillips et al., 1979; Sandra et al., 2011). Cette augmentation des LIE a été constatée chez des souris immunisées a l'albumine d'œuf et dans quelques maladies gastro-intestinales (Jarry et al., 1990). Une étude prospective a été menée à la gastro-entérologie pédiatrique, les biopsies endoscopiques des enfants allergiques aux protéines du lait de vache montrent une érosions superficielles, infiltration éosinophile et hyperplasie nodulaire lymphoïde fréquentes (Xanthakos et al., 2005).

La suspicion clinique de la rectocolite allergique a été confirmée chez des patients allergiques aux protéines du lait de vache par des biopsies endoscopiques, qui ont montré une inflammation à éosinophiles, qui est une conclusion commune dans l'allergie alimentaire (Turunen et al., 2004; Iacono et al., 2007; Troncone et al., 2009). Certains auteurs ont suggéré que l'immaturation intestinale et l'infiltration des éosinophile, peut modifier de manière significative les jonctions serrées, entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale aux protéines alimentaires (Boné et al., 2009). Sur le plan fondamental, l'APLV est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale aux protéines, au stade aigu de la maladie (Ayad et al., 2008).

Nos résultats ont montré également que l'aspect de la muqueuse intestinale des souris ayant suivis un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz indique une amélioration au niveau de la structure de la muqueuse intestinale comparé aux témoins positifs. Les villosités sont de plus en plus longues et fines avec une augmentation hautement significative de la hauteur

villositaire par rapport aux groupes témoins positifs et une infiltration lymphocytaire similaire au groupe témoin négatif. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Kaczmarek et al., (1989) qui ont montré que lorsque l'antigène sensibilisant est éliminé de l'alimentation des deux groupes d'enfants dont l'un est intolérant aux protéines du lait de vache et l'autre intolérant au gluten, il a été constaté une diminution des lymphocytes intra épithéliaux.

Ces résultats suggèrent que la formule à base de protéines du riz semble être une alternative contre les allergies aux protéines du lait de vache contrairement aux formules de soja qui n'ont aucun intérêt dans la prévention de l'allergie car les protéines de soja sont aussi antigéniques que les protéines du lait de vache, plusieurs publications rapportent la survenue d'entéropathies avec atrophie villositaire similaires à celles rapportées lors des allergies aux protéines bovines (Agostoni et al., 2006).

La dernière partie de notre travail nous permet d'évaluer le degré d'allergénicité des préparations infantiles (standard, soja, riz hydrolysé), afin d'approcher l'interaction in vitro en chambre de Ussing de ces formules infantiles, ainsi que les protéines du lait de vache (α -La, β -Lg) avec les cellules immunocompétentes et de préciser cette action sur les mouvements des électrolytes (sodium, chlore) reflétés par le courant de court-circuit (Isc) et la conductance (G). De plus, les paramètres électrophysiologiques (Isc, G) permettent de contrôler tout au long de l'expérience la viabilité du tissu. En effet, la conductance du tissu reflète la perméabilité des jonctions serrées vis-à-vis des ions inorganiques, principalement des cations (Gumbiner, 1987). Une conductance élevée traduit une atteinte du tissu. Enfin, l'adjonction enfin d'expérience de glucose dans le milieu permet facilement de vérifier que le transport des sucres reste fonctionnel, ce qui constitue un autre contrôle et une preuve de la viabilité des tissus.

Dans nos résultats, il est clair que l'ajout de l'antigène (β -Lg ou α -La) au versant séreux des jéjunums des souris immunisées à la β -Lg ou α -La montés en chambre de Ussing, modifie les paramètres électrophysiologiques en augmentant significativement le courant de court circuit. Cette réponse est spécifique à l'antigène sensibilisant car lorsqu'on expose les fragments jéjunaux de souris immunisées à l'ovalbumine l'Isc reste stable durant toute la durée de l'expérience. Ces paramètres électriques sont une mesure des mouvements ioniques à travers

l'épithélium et leur modification reflète aussi le changement dans le transport des ions, principalement du Na⁺ et du Cl⁻.

Nos résultats concordent, avec ceux rapportés par la littérature (Yang et al., 2000 ; Addou et al., 2004 ; Saidi et al., 2005; El Mecherfi, 2012). Ces études ont montré l'augmentation significative du courant de court circuit après la mise en contact de l'antigène sensibilisant avec les fragments intestinaux montés en chambre de Ussing. On peut traduire cette augmentation de l'Isc par le fait que la β -Lg, α -La, agissent sur les tissus des animaux sensibilisés en augmentant la sécrétion électrogénique de Na⁺ et Cl⁻, qui serait l'une des conséquences du passage des allergènes intacts ou presque à travers l'épithélium intestinal.

Une autre étude réalisée sur des poules immunisées à la SAB a montré qu'en chambre de Ussing, une forte stimulation de l'Isc est enregistrée, dès la première minute de stimulation avec la protéine sensibilisante (Caldwell et al., 2001).

Afin de connaître la nature de l'augmentation de l'Isc, les tissus d'animaux sont traités au furosémide à la concentration finale de 5×10^{-2} . Ce diurétique est connu pour agir rapidement sur l'inhibition du cotransporteur Cl/Na/K au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte. Aucune augmentation de l'Isc n'est observée lors du dépôt du furosémide, et ces résultats permettent donc de conclure que dans notre modèle d'étude, les variations du courant de court-circuit de base induites par l'antigène sensibilisant sont essentiellement dues à un courant de chlore. Cela concorde avec les résultats de (Negaoui et al., 2009), ces derniers mettent en évidence que lorsque le furosémide est ajouté, l'Isc des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg et au lactosérum natif ne vari pas après la stimulation antigénique.

Nos résultats ont aussi révélé, une stimulation significative de la conductance chez nos souris immunisées. Ceci reflète une atteinte de l'épithélium intestinal au niveau des jonctions serrées des souris sensibilisées. Les réactions d'hypersensibilités immédiates suivie par la sécrétion d'ions sont initiées par l'interaction des antigènes aux anticorps IgE à la surface des cellules mastocytaires de la muqueuse intestinale, en libérant des médiateurs (histamine, cytokines...) qui agissent sur des récepteurs se trouvant à la surface des cellules épithéliales (Rancé et al., 2007 ; Merja et al., 2007). Pour faciliter d'un coté, le passage des macromolécules

au niveau des jonctions serrées (Perdue et al., 1999) et augmenter la production des immunoglobulines spécifiques aux protéines du lait d'un autre. Il est important de préciser que l'allergénicité des PLV dépend de deux caractéristiques. La première est leur structure tridimensionnelle, la seconde est la présence d'épitopes antigéniques, selon Cocco et al., (2007) la structure tertiaire de la β -Lg est une caractéristique qui le rend potentiellement très allergénique. Il a été rapporté que plusieurs régions de la β -Lg étaient mises en cause dans la réaction allergique, dont la plupart étaient spécifiques aux IgE (Zeece et al., 2008).

L'observation de manifestations cliniques provoquées par l'introduction des antigènes sensibilisants (β -Lg, α -La) correspond à une réponse clinique positive allant jusqu'au stade 4. Qui est due à une réaction allergique médiées par les IgE qui déclenchent une cascade de médiateurs immunitaires responsable de ces signes cliniques.

Lifrani, 2006 a montré que les souris sensibilisés par voie intra-péritonéale à différentes protéines alimentaires allergisantes (arachide, albumine, caséine et colle de poisson) entraînant des manifestations cliniques pouvant aboutir à un choc anaphylactique suite aux tests de provocation in vivo.

Le dépôt du lait de vache et le lait infantile standard sur les fragments de souris sensibilisées à la β -Lg, α -La stimule le courant de court circuit, cela ce traduit par une fixation de l'antigène (β -Lg, α -La) sur les IgE fixés sur les mastocytes, lymphocytes, les plaquettes et la provocation d'une réaction anaphylactique locale au niveau des tissus des souris sensibilisées.

L'interaction de la formule infantile à base de soja avec les muqueuses de souris sensibilisées montre que cette formule stimule significativement le courant de court circuit (Isc), traduisant une forte réaction croisée.

Certains enfants allergiques aux protéines du lait de vache reçoivent une alimentation substitutive par du lait de soja. Toutefois, selon l'âge des enfants et selon les études, 1 à 37 % de ces enfants présentent une sensibilisation et non exceptionnellement, une allergie au lait de soja. L'un des allergènes majeurs responsables de cette réactivité croisée est la glycinine A4A5B3 (Ponvert, 2009).

L'allergie au soja est rare mais les dernières données du réseau d'allergo-vigilance ont mis en évidence le soja comme un des principaux allergènes émergent (Moneret-Vautrin et al., 2011; Gomez, 2012). Les hydrolysats de protéines de soja comme Biomil SOY qui est disponible en Algérie, sont des produits diététiques qui ne contiennent pas de PLV et assurent un apport nutritionnel équivalent à celui des hydrolysats extensive de lait, mais ces préparations ne sont pas recommandées dans tous les cas d'APLV car 17% à 47% des enfants allergiques au lait peuvent présenter des allergies au soja (EL-Agamie, 2007).

Nos résultats montrent également que le dépôt de la formule infantile à base de riz hydrolysé dans le versant séreux des souris sensibilisées à la β -Lg, α -La, ne provoque aucun changement des paramètres électrophysiologiques (Isc, G), et ces derniers restent stable durant toute la durée de l'expérience. Cela confirme que la formule à base de riz hydrolysé ne provoque pas une réaction croisée comme celle obtenue avec la formule à base de soja. Cette formule est une nouvelle alternative aux formules standards à base de lait de vache et de soja (Fiocchi et al., 2003; Tormo et al., 2011).

Selon Pramil et Rancé, (2011), douze enfants allergiques aux protéines du lait de vache, l'âge moyen des enfants est de neuf mois (extrêmes 4–14 mois), lors de la consultation pour un bilan d'allergologie les prick-tests au hydrolysate de riz Modilac riz₁[®] étaient négatifs chez les 12 enfants. De même, dans les travaux de Luigi et al., (2002), une formule hydrolysée à base de riz est tolérée par 18 enfants allergiques à la fois pour le lait de vache et aux protéines de soja. Dans les travaux de Girardet et al., (2010) l'étude des formules à base de riz hydrolysé a montré sa bonne tolérance chez 90 % des enfants (âge moyen 4,4 mois) souffrant d'APLV.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés fonctionnelles des protéines d'une préparation infantile à base de riz hydrolysé (Modilac expert riz[®]) pour vérifier s'il existe une réaction croisée entre les protéines du riz extensivement hydrolysées et les anticorps dirigés contre la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine.

La première partie de notre travail, nous a permis de faire une approche sur les caractéristiques biochimiques des protéines de la formule à base de riz (Modilac expert riz[®]), et celles des protéines du lait de vache. Nos résultats nous ont permis de montrer que:

- La teneur en protéines de la préparation à base de protéines de riz est proche de la concentration protéique du lait maternel ainsi que cette concentration est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson.
- L'absence des bandes électrophorétiques dans le profil de la préparation à base de riz hydrolysé traduit l'absence des protéines intactes dans la formule.

Dans la seconde partie de notre travail nous avons évalué les conséquences de la consommation d'un hydrolysate de protéines de riz sur l'évolution du poids corporel chez des souris immunisées à la β -Lg et à l' α -La, ayant ensuite consommé de l'hydrolysate de protéines de riz pendant 28 jours. Les résultats obtenus montrent que :

- La croissance pondérale chez l'ensemble des groupes expérimentaux augmente progressivement en fonction du temps, mais la consommation de l'hydrolysate de protéines de riz provoque une diminution du degré d'évolution du poids corporel chez les souris nourries avec cette formule infantile par rapport aux souris témoins.

La troisième partie du travail, nous a permis d'étudier l'antigénicité de la formule infantile à base d'hydrolysate de protéines de riz (Modilac expert riz[®]). Les résultats obtenus montrent que :

- Aucune réactivité n'a été enregistrée entre les protéines de riz hydrolysées (Modilac expert riz[®]) et les IgG anti β -Lg et anti α -La.

La quatrième partie de notre travail nous a permis de déterminer l'effet de la formule à base de protéines de riz hydrolysées sur l'aspect histologique de l'intestin des souris. Les résultats obtenus montrent :

- Une augmentation de la hauteur villositaire au niveau de la structure de la muqueuse intestinale des souris ayant suivis un régime à base d'hydrolysate de protéines de riz par rapport aux groupes témoins positifs, et une infiltration lymphocytaire comparable au groupe témoin négatif.

La dernière partie de notre travail nous permet d'évaluer le degré d'allergénicité des préparations infantiles (standard, soja, riz hydrolysé), afin d'approcher l'interaction in vitro en chambre de Ussing de ces formules infantiles, ainsi que les protéines du lait de vache (α -La, β -Lg) avec les cellules immunocompétentes et de préciser cette action sur les mouvements des électrolytes (sodium, chlore) reflétés par le courant de court-circuit (Isc) et la conductance (G).

- Nos résultats indiquent que le dépôt de la formule infantile à base de riz dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés ne se traduit par aucun effet significatif sur l'Isc. En revanche, le dépôt d'une formule infantile à base de soja stimule significativement le courant de court-circuit (Isc), traduisant une forte réaction croisée. Cette réponse est comparable à celle obtenue avec les protéines sensibilisantes (β -Lg, α -La), le lait de vache et la formule infantile standard, traduisant une sécrétion active du chlore, suggérant une réaction anaphylactique locale.
- L'introduction des antigènes sensibilisants (α -La, β -Lg) présente des manifestations cliniques positives définissant un signe d'allergie.

Les préparations à base de protéines de riz hydrolysées semblent être une alternative possible en cas d'allergie aux protéines de lait de vache mais comme toutes les protéines végétales elles sont déficitaires en acides aminés essentiels et doivent être supplémenté pour obtenir un aminogramme conforme à celui du lait maternel. D'autres études sont nécessaires pour prouver l'efficacité nutritionnelle de ces formules végétales.

Références Bibliographiques

Références

- **Addou S, Tomé D, Kheroua O, Saidi D.** Parenteral immunization to β -lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit. *Inter Immunophar*, 2004; 4: 1559-1563.
- **Addou S, Zériouh I, Bouferkas Y, Khéroua O, Saidi D.** Conséquence de la consommation de lait de soja sur la fertilité masculine. *Aliments/ Rev F Allergol*, 2013; 53: 334–341.
- **Aboudiab T, Jarosson L, Chouraki JP, et al.** Anorexie révélatrice d'une intolérance aux protéines du lait de vache. *Arch Pediatr*, 2003;10: 649–50.
- **Aboudiab T, Léké L, Zahreddine K, et al.** L'hypersensibilité non IgE-dépendante aux protéines du lait de vache serait-elle une des causes de l'hyperactivité de l'enfant? *Pediatr Puer*, 2007; (3– 4):111–3.
- **Adel-Patient KBH, Ah-Leung S, Créminon C, Wal JM.** Peanut-and cow's milk-specific IgE, Th₂ cells and local anaphylactic reaction are induced in balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 2005; 60: 658–64.
- **Adel-Patient KN MA, Proust B, Silva JRL, Créminon C, Wal JM, Vargaftig BB.** Elicitation of the allergic reaction in beta lactoglobulin sensitized balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy*, 2003; 33:376–85.
- **Adel K, Bernard H, Wal J.** Devenir des allergènes dans le tube digestif. *Rev F Allergol*, 2008; 48:335–343.

- **Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, et al.** Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006; 42: 352–61.
- **Agostoni C, Fiocchi A, Riva E, et al.** Growth of infants with IgE mediated cow's milk allergy fed different formulas in the complementary feeding period. *Pediatr Allergy Immunol*, 2007;18: 599–606.
- **Agostini C, Decsi T, Fewtrell M, et al.** Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008; 46: 99-110.
- **Allen CW, Campbell DE, Kemp AS.** Food Allergy: is strict avoidance the only answer? *Pediatr Allergy Immunol*, 2009; 20: 415-22.
- **Angelika P, Matthias B.** Stability of bovine allergens during food processing *Annals of Allergy. Asthma & Immunol*, 2002; 89:16–20.
- **Ayad N, Hellal B, Maatoug M.** Effets sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2008; 48: 9–13.
- **Barbi E, Berti I, Longo G.** **Food Allergy:** from the loss of tolerance induced by exclusion diets to specific oral tolerance induction. *Recent pat inflamm Allergy drug Discove*, 2008; 2: 212-4.
- **Baret M, Venaille A, Thomassin N, Chouraqui J-P.** Statut nutritionnel des enfants allergiques aux protéines du lait de vache. *Archiv Pédiatr*, 2013; 20: 536-558.
- **Ballmer P.E., Steffen P., Imoberdorf R.** Malnutrition une pathologie très méconnue. *Med Suisse*, 2001; 36: 887-891.

- **Bhatia J, Greer F.** American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*, 2008; 121: 1062–8.
- **Bidat E.** Comment adapter le régime d'éviction avec le bilan allergologique. *Rev F Allergol*, 2009; 49:112-115.
- **Bocquet A, Bresson JL, Briend A, et al.** Préparations pour nourrissons et préparations de suite à base de protéines de soja : données actuelles. *Arch Pediatr*, 2001; 8: 1226–33.
- **Bodinier M, Legoux MA, Pineau F, Triballeau S, Segain JP, Brossard C, et al.** Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line. *J Agric Food Chem*, 2007; 55:4576–83.
- **Bodinier M, Leroy M, Adel-Patient K.** Modèles animaux d'allergie alimentaire. Application aux protéines de blé. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2008; 48: 526–532.
- **Boné J, Claver A, Guallar I, Plaza AM.** Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanism, diagnosis and treatment. *Allergol Immunopathol*, 2009; 37: 36–42.
- **Boughellout H, Zidoune M.N.** Allergie aux protéines du lait de vache et type d'allaitement pratiqué chez le nourrisson dans l'est Algérien. *Rev F Allergol*, 2012; 52: 250–254.
- **Boyano-Martinez T, Garcia-Ara C, Pedrosa M, Diaz-Pena JM, Qunice S.** Accidental allergic reaction in children allergic to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2009; 123:883–9.
- **Brahim A.C, Addou S, Kheroua O, Saidi D.** Étude de l'allergénicité d'un lait extensivement hydrolysé. *Rev Fr Allergol*, 2012; 52: 305–310.

- **Burks AW, Laubach S, Jones SM.** Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 2008; 121: 1344-1350.
- **Caldwell DJ, Harari Y, Hargis BM, Castro GA.** Intestinal anaphylaxis in chickens: epithelial ion secretion as a determinant and potential component of functional immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001; 25: 169-176.
- **Catherine J, Eric B.** Techniques ELISA en auto-immunité. *GEAI L'INFO. Numéro Spécial*, 2005; 10-12.
- **Chabbert-Broué A, Juchet A.** Quand prescrire et comment interpréter le dosage des allergènes moléculaires en allergie alimentaire? *Rev F Allergol*, 2012; 52: 234–236.
- **Chambers SJ, Wickham MS, Regoli M, Bertelli E, Gunning PA, Nicoletti C.** Rapid in vivo transport of proteins from digested allergen across presensitized gut. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 325:1258–63.
- **Chin J, Turner B, Barchia I, Mulbacher A.** Immune response to orally consumed antigens and probiotic bacteria. *Immunol and Cell Bio*, 2000; 78: 55-56.
- **Chouraqui J-P, Dupont C, Bocquet A, Bresson J-L, Briend A, Darmaun D, Frelut ML, Ghisolfi J, Girardet J-P, Goulet O, Putet G, Rieu D, Rigo J, Turck D, Vidailhet M.** Alimentation des premiers mois de vie et prévention de l'allergie. *Arch Pédiatr*, 2008; 15: 431-442.
- **Christie L, Hine RJ, Parker JG, BurksW.** Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *J Am Diet Assoc*, 2002; 102 (11):1648–51.

- **Cocco RR, Jarvinen K-M, Han N, Beyer K, Sampson HA.** Mutational analysis of immunoglobulin E-binding epitopes of β -casein and β -lactoglobulin showed a heterogeneous pattern of critical amino acids between individual patients and pooled sera. *Clin Exp Allergy*, 2007; 37: 831-838.
- **Comité de nutrition de la Société française de pédiatrie.** Phyto-estrogènes et aliments à base de soja chez le nourrisson et l'enfant : la prudence est de mise. *Arch Pediatr*, 2006; 13:1091-3.
- **Crenn P.** Dénutrition malnutrition: principe du traitement. *Rev F Labo*, 2001; 2001(334): 29-35.
- **Commission des communautés européennes.** Directive 2006/141/CE de la Commission du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite. *Journal officiel de l'Union européenne*, 30.12.2006.
- **Das UN.** Breast-feeding, atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113:1002.
- **Davis PJ, Smales CM, James DC.** How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy*, 2001; 56: 56-60.
- **D'Auria E, Sala M, Lodi F, et al.** Nutritional value of a rice-hydrolysate formula in infants with cows' milk protein allergy: a randomized pilot study. *J Int Med Res*, 2003; 31: 215-22.
- **Dearman RJK I.** Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicol Lett*, 2001; 120:181-6.
- **Dearman RJK.** Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose response analyses. *Clin Exp Allergy*, 2003; 33:1586-94.

- **De Boissieu D.** Comment utiliser le Diallertest[®] ? J Pédiatr Puér, 2006; 19:149–152.
- **De Boissieu D, Dupont C.** Allergie aux hydrolysats de protéines du lait chez l'enfant. Arch Pédiatr, 2007; 14: 124-126.
- **De Boissieu D, Dupont C.** Allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants : safety and duration of amino acid based formula. J Pediatr, 2002 ;141:271-3.
- **De Boissieu D.** Allergie aux protéines du lait de vache. Mises au point interactives, Hôpital Necker.PARIS, 2013; 179: 11p.
- **Délzenne N, Cani P.** Gut microflora is a Key player in host energy homeostasis. Medecine Sciences, 2008; 24:505-10.
- **Denisa M, Loras-Duclauxa I, Lachaux A.** Sensibilisation et allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant allaité. Archiv Pédiatr, 2012;19:305-312.
- **Diane F, Noël P, Baptiste H, Yves G, Sonia C, Laure H, Irène L, Nicolas C, Capucine D, Fleur C, Sophie H, Alain L, Étienne J.** Complications carenciales suite à l'utilisation de « laits » végétaux, chez des nourrissons de deux mois et demi à 14 mois (quatre cas). Presse Med, 2013; 42: 37–43.
- **Doan M, Vodoff-Oehler M.V, Newinger G, Rance F, De Blay F.** Evaluation du statut allergologique à distance d'un test de provocation oral pour une allergie aux protéines de lait de vache : à propos de 41 cas. Rev Fr Allergol, 2012; 52: 250–254.
- **Dumond P, Morisset M, Sergeant P, et al.** Allergie alimentaire au lait de vache ou intolérance au lactose? J Pediatr Puer, 2006; 19: 256–60.
- **Dupont C.** L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). J Pédiatr Puéricul, 2008; 21 : 156-157.

- **Dupont C, Chouraqui J-P, De Boissieu D. Bocquet A, Bresson J-L, Briend A, Darmaun D, Frelut M-L, Ghisolfi J, Girardet J-P, Goulet O, Hankard R, Rieu D, Rigo J, Vidailhet M, Turck D.** Prise en charge diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. *Archiv Pédiatr*, 2011; 18:79-94.
- **Dupont C, De Boissieu D.** Aliments et dermatite atopique. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2005; 45: 114-126.
- **Dupont C.** Allergies alimentaires: diagnostic, suivi et traitement. *Rev Fr Lab*, 2012; 19-22.
- **Dutau G , Rancé F.** Historique et description des principales allergies croisées. *Rev Fr Allergol*, 2009; 49: 180–188.
- **Dutau G.** Glossaire clinique, In: Dutau G, editor. 2^{ème} édition, *Allergologie*, 1, 2^{ème} édition Paris: Masson Édit; 2006: 267.
- **EFSA.** Panel on dietetic products, nutrition and allergies. Scientific opinion on the appropriate age for introduction of complementary feeding of infants. *EFSA J*, 2009;7:1423.
- **El-Agamy E.I.** The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 2007; 68: 64–72.
- **Elbez A.** Des « laits » qui n'en sont pas. *Med Enf*, 2006; 26:103-8.
- **El Mecherfi K.** Evaluation de l'immunoréactivité et de l'allergénicité des lactoprotéines bovines après hydrolyse enzymatique combiné a un traitement microonde. Intérêt des biopuces à allergènes dans la multi-détection des réponses IgE spécifiques chez des enfants poly sensibilisés aux protéines de lait de vache. Thèse de doctorat. Université

d'Oran, 2012; p 174.

- **Ferrara M, Coppola L, Coppola A, et al.** Iron deficiency in childhood and adolescence: retrospective review. *Hematol*, 2006;11:183–6.
- **Fiocchi A, Brozek J, Schunemann H, et al.** World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010; 21:1–125.
- **Fiocchi A, Schunemann H, Brozek J, Restani P, Beyer K, Troncone R, et al.** Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 126:1119–28.
- **Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna L. S, Von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzman M. A, Li H, Heine R.G, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S.** World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *WAO Journal*, 2010.
- **Fiocchi A, Restani P, Bernardini R.** A hydrolyzed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy*, 2006; 36:311–6.
- **Fiocchi A, Travaini M, D'Auria E.** Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clin Exp Allergy*, 2003; 33:1576-80.
- **Fortun-Lamothe L, Boullier S.** Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress*. Puebla, 2004: 1035-1067.

- **Fontenla De Petrino S, Prchal A, Fontenela M, Cena A.M, Gomez J, Pintos S, Peral M.C.** Recovery from experimental malnutrition with soymilk: immunological and genetic aspect. *Nutr Hosp*, 2007; 22 (2): 244-251.
- **Fox A, Du Toit G, Lang A, et al.** Food allergy as a risk factor for nutritional rickets. *Pediatr Allergy Immunol*, 2004; 15: 566–9.
- **François L.** Les apports en physiologie digestive et métabolique. *CUNICULTURE*, 2005; 32:19-30.
- **Friedman NJ, Zeiger RS.** The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115: 1238-1248.
- **Frossard P, Tropia L, Hauser C, Eigenmann P.** Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: 958-964.
- **Ghisolfi J, A. Bocquet, Bresson J-L, Briend A, Chouraqui J-P, Darmaun D, Dupont C, Frelut M.L, Girardet J-P, Goulet O, Hankard R, Rieu D, Simeoni U, Turck D, Vidailhet M.** Les aliments industriels (hors laits et céréales) destinés aux nourrissons et enfants en bas âge : un progrès diététique ? *Archi Pédiatr*, 2013; 20:523-532.
- **Girardet J.P, Rivero M, Orbegozo J, David T, Boulanger S, Moisson de Vaux A, Johnston S, Marin V.** Efficacité sur la croissance et tolérance d'une préparation pour nourrissons à base de protéines de riz hydrolysées. *Arch Pédiatr*, 2013; 20: 323–328.
- **Girardet J.P, Rivero M, Orbegozo J, et al.** Tolérance d'une formule infantile de protéines de riz hydrolysées. *Arch Pédiatr*, 2010; 17:1-178.
- **Giorgio L. Piacentini, Lucia Vicentini, Alessandro Bordini, Paola Mazzi, Diego G, et al.** Allergenicity of a hydrolyzed rice infant formula in a guinea pig model *Annals of*

Allergy. Asthma & Immunol, 2003; 91:161–64.

- **Gomez-Andre S-A, Deschildre A, Bienvenu F, Just J.** Un allergène émergent: le soja. Rev F Allergol, 2012; 52: 448–453.
- **Guarner F.** Enteric Flora in Health and Disease. J Article Rev, 2006; 73: 5-12.
- **Guénard-Bilbault L, D.A.Moneret-Vautrin.** Allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant. J Pédiatr Puéricul, 2003; 16: 36-43.
- **Gumbiner B.** Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. Am J Physiol, 1987; 253: C749-C758.
- **Hayat M, Cairns A, Dixon MF, Mahony S.** Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? J Clin Pathol, 2002; 55: 393–4.
- **Hill DJ, Murch SH, Rafferty K, Wallis P, Green CJ.** The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: a systematic review. Clin Exp Allergy, 2007; 37: 808–22.
- **Hould R.** Technique d'histopathologie et de cytologie. Montréal: Décarie, 1984; 47:156.
- **Høst A.** Frequency of cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002; 89: 33–7.
- **Host A, Halken S, Jacobsen HP.** Clinical course of cow's milk protein allergy /intolerance and atopic diseases in childhood. Pediatr Allergy immunol, 2002; 13: 23-8.
- **Huifeng N, Jiangfang Q, Zhenghui L, Zhaomiao L, Ganghua L, Qiangsheng W, Shaohua W, Yanfeng D.** Distribution of proteins and amino acids in milled and brown rice as affected by nitrogen fertilization and genotype. Journal of Cereal Science, 2010;

52: 90-95.

- **Iacono G, Ravelli A, Di Prima L. et al.** Colonic lymphoid nodular hyperplasia in children:relationship to food hypersensitivity. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007; 5:361–6.
- **Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, et al.** Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in coeliac disease. *Gastroenterology*, 2000; 118: 867–79.
- **Jacotot B.** Nutrition humaine. *Health & Fitness*, 2003; p: 311.
- **Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-grand D.** Subsets of CD3+ (T- cell receptor α/β or γ/δ and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol*, 1990; 20: 1097-103.
- **Johnsen C, East J, Glassman P.** Management of malnutrition in the elderly and the appropriate use of commercially manufactured oral nutritional supplements, *J of Nutr Health & Aging*, 2000; 4(1): 42-46.
- **Kaczmarek M, Lisiecka M, Kurpatkowska B, Jastrzebska J.** Quantitative estimation of cellular infiltration of the small intestinal mucosa in children with cow's milk and gluten intolerance. *Acta Med Pol*, 1989; 303-4: 129-139.
- **Kalamoun I, Chabchoub H, Aloulou L, Gargouri K, Aissa T, Kammoun A, Mahfoudh M, Hachicha.** Allergie aux hydrolysats de proteines du lait de vache : à propos de 2 cas. *Archi Pédiatr*, 2010; 17:1-178.
- **Klemola T, Vanto T, Juntunen-Backman K, et al.** Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. *J Pediatr*, 2002; 140: 219–24.

- **Knippels L.M, Van Der Kleij H.P, Koppelman S.J, Houben G.F, Penninkks A.H.** Comparaison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy*, 2000; 55: 251-258.
- **Koo W, Lasekan JB.** Rice protein-based infant formula: current status and future development. *Minerva Pediatr*, 2007; 59: 35-41.
- **Kramer MS, Matush L, Vanilovich I.** Effects of prolonged and exclusive breast feeding on risk of allergy and asthma: cluster randomised trial. *BMJ*, 2007; 335: 815.
- **Kull I, Almquist C, Lilja G.** Breast-feeding reduces the risk of asthma during the 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114: 755-760.
- **Kull I, Bohme M, Wahlgren CF.** Breast-feeding reduces the risk for childhood eczema. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 116: 657-661.
- **Lack G.** Food allergy. *N Engl J Med*, 2008; 359: 1252-1260.
- **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
- **Lasekan B, Koo W, Walters J, et al.** Growth, tolerance and biochemical measures in healthy infants fed a partially hydrolyzed rice protein-based formula: a randomized, blinded, prospective trial. *J Am Coll Nutr*, 2006; 25:12-9.
- **Levine S, Saltzman A.** Distribution of small intestine lesions in anaphylaxis of rat. *Int Arch Allergy Immuno*, 1998; 115: 312-315.

- **Lifrani A.** Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires, mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et la colle de poisson. These de Doctorat. Ecole doctorale Abies. Institut National Agronomique Paris-Grignon, 2006; 123p.
- **Liu T, Howard RM, Mancini AJ, et al.** Kwashiorkor in the United States: fad diets, perceived and true milk allergy, and nutritional ignorance. *Arch Dermatol*, 2001; 137: 630–6.
- **Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.I,** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 193-251.
- **Luigi Terracciano, Patrizia Isoardi, Sergio Arrigoni, Alexa Zoja, Alberto Martelli.** Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy *Annals of Allergy. Asthma & Immunol*, 2002; 89: 86–90.
- **Malamut G, Matysiak-Budnik T, Grosdider E, Jais JP, Morales E, Damotte Det al.** Adult coeliac disease with severe or partial villous atrophy: a comparative study. *Gastroenterol Clin Biol*, 2008; 32: 236–42.
- **Mallegol J, van Niel G, Heyman M.** Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol Dis*, 2005; 35:11–6.
- **Martine H.** Antigènes alimentaires, barrière intestinale et immunité muqueuse. *Cahier de Nutrition*, 2010; 45: 65–71.
- **Massa G, Vanoppen A, Gillis P, Aerssens P, Alliet P, Raes M.** Protein malnutrition due to replacement of milk by rice drink. *Eur J Pediatr*, 2001; 160: 382-4.
- **McCaskill AC, Hosking CS, Hill DJ.** Anaphylaxis following intranasal challenge of mice sensitized with ovalbumin. *Immunology*, 1984; 51(4): 669-77.

- **Mehr SS, Kakakios AM, Kemp AS.** Rice: a common and severe cause of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Arch Dis Child*, 2009, 94: 220-223.
- **Merja N, Sirpa J, Marja-Leena L, Hans S, Soili M-K, Johanna MK, Nina H, Tari H, Kristiina T, Juha R.** Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -Lactoglobulin allergen. *Structure*, 2007; 15: 1413-1421.
- **Mine Y, Yang M.** Epitope characterization of ovalbumin in balb/c mice using different entry routes. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1774: 200–12.
- **Molkhou P.** Allergies alimentaires chez l'enfant. *Encycl Med Chir (Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris), AKOS Encyclopédie pratique de médecine*, 2002; 8-0319.
- **Moneret-Vautrin D.A, Kanny G.** Axes de recherche en allergologie alimentaire: hypoallergénicité et vaccins. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2007; 47: 305–313.
- **Moneret-Vautrin DA, Renaudin JM, Parisot L.** L'Anaphylaxie alimentaire sévère en 2010: à propos de 136 cas déclarés au réseau allergeo-vigilance. *Alim Inter*, 2011;16:48–9.
- **Moreno FJ, Rubio LA, Olano A, Clemente A.** Uptake of 2S Albumin allergens, Ver e1 and Ses e1, across human Intestinal Epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*, 2006; 54:8631–9.
- **Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Guenard L, Cuny JM, Frenzt P, Hatahet R.** Oral desensitization in children with milk and egg allergies obtains recovery in a significant proportion of cases. A randomized study in 60 children with cow's milk allergy and 90 children with egg allergy. *Allergy Clin Immunol*, 2007; 39:12-19.

- **Moudoulet L.** Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 2005; 249p.
- **Nancey S, Moussata D, Roman S, Andre, Bouvier M, Claudel S, Descos L, Andre C, Flourie B.** L'allergie alimentaire et digestive chez l'adulte. *Gastroentérologie Clin Biol*, 2005; 29:255-265.
- **Negaoui H.** Evaluation des effets du traitement du lait de vache aux micro-ondes et aux rayons gamma sur l'allergénicité des protéines du lactosérum chez des souris Balb/c utilisées comme modèle d'expérimentation d'allergie. Mémoire de Magister. Université d'Oran, 2007; 118 p.
- **Nové L J.** Digestion et absorption, *AVCN*, 2008; p : 1-9.
- **Nowak-Wegrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Wanich N, et al.** Tolerance to exclusively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2008; 122: 342–7.
- **Osborn DA, Sinn J.** Formulas containing hydrolyzed protein for urticaire prevention of allergy and food intolerance in infants (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003.
- **Patey N, Verkarre V, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Schmitz J, Brousse N.** Diagnostic étiologique d'une atrophie villositaire. *Gastroenterol Clin Biol*, 2000; 24:436–46.
- **Patrick T, Françoise S.** Alimentation de L'enfant de 0 à 3 Ans. *Cahier de Nutrition*, 2011: 13–30.

- **Pauli G.** Allergènes végétaux alimentaires identifiés (en dehors de l'arachide). *Rev F Allergol*, 2011; 51:56–62.
- **Paupe J, Paty E, De Blic J, et al.** L'allergie au lait de vache du nourrisson. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 2001;41:424–36.
- **Perdue MH.** Mucosal immunity and inflammation III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1999; 277: 1-5.
- **Petrovsky N, Aguilar JC.** Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Special Feature: Immunological Adjuvants. *Immunol Cell Biology*, 2004; 82: 488-496.
- **Pétrus M, Lacrampe M, Villefranche C, Cossarizza G, Dutau G.** Allergie aux protéines du lait et aux hydrolysats de protéines de lait : à propos d'une observation au diagnostic retardé. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2006;46:416–8.
- **Phillips A.D, Rice S.J, France N.E, Walker-Smith J.A.** Small intestinal intraepithelial lymphocyte level in cow's milk protein intolerance. *Gut*, 1979; 20: 509-512.
- **Pincioli M, Vidal A. A, Anon M.C, Martinez N. E.** Comparison between protein functional properties of two rice cultivars, *LWT. Food Science and Technology*, 2009; 42: 1605–1610.
- **Ponvert C.** Quoi de neuf en allergologie pédiatrique en 2007–2008 ? Partie 3: allergies cutanées, alimentaires et médicamenteuses (une revue de la littérature internationale d'octobre 2007 à septembre–octobre 2008). *Rev Fr Allergol*, 2009; 49: 383–396.

- **Poulsen O, Hau J, Kollerup J.** Effect of homogenization and pasteurization on the allergenicity of bovine milk analysed by a murine anaphylactic shock model. *Clin Allergy*, 1987; 17(5): 449-58.
- **Pramil A, Rancé F.** Intérêt des prick-tests aux hydrolysats dans l'allergie IgE-dépendante aux protéines du lait de vache de l'enfant. *Rev F Allergol*, 2011; 51: 531–534.
- **Pujol A.M.** La flore intestinale son rôle, son équilibre et les probiotiques. *Soleil-vert*, 2009; 65.
- **Rancé F.** Diététique de l'enfant atteint de dermatite atopique. *Arch Pediatr*, 2005; 12: 912–4.
- **Rancé F, Deschildre A, Dutau G.** Définitions des termes utilisés en allergologie alimentaire chez l'enfant. *Rev F Allergol*, 2008; 48: 73–90.
- **Rance F, Dutau G.** Actualités sur l'exploration et la prise en charge de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *Rev Fr Allergol*, 2009; 49: 28–33.
- **Rance F.** Lymphocytes T et allergie alimentaire. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2007; 47:214-218.
- **Reche M, Pascual C, Fiandor A, et al.** The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010; 21: 577–585.
- **Rothenbacher D, Weyermann M, Beermann C, Brenner H.** Breastfeeding, soluble CD14 concentration in breast milk and risk of atopic dermatitis and asthma in early childhood: birth cohort study. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35: 1014-1021.

- **Rothenberg ME.** Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113: 11-28.
- **Rouquette P.** Maladie cœliaque, intolérance aux protéines de lait de vache. Problème de diagnostic différentiel et intérêt de la numération des lymphocytes inter-épithéliaux (thèse); 1980.
- **Rytkönen J, Valkonen KH, Virtanen V, Foxwell RA, Kyd JM, Cripps AW, et al.** Enterocyte and M-cell transport of native and heat-denatured bovine beta-lactoglobulin: significance of heat denaturation. *J Agric Food Chem*, 2006; 54:1500–7.
- **Rzehak P, Sausenthaler S, Koletzko S, et al.** Period-specific growth, overweight and modification by breastfeeding in the GINI and LISA birth cohorts up to age 6 years. *Eur J Epidemiol*, 2009; 24: 449–67.
- **Rzehak P, Sausenthaler S, Koletzko S, et al.** Short- and long-term effects of feeding hydrolyzed protein infant formulas on growth at <or 6 years of age results from the German Infant Nutritional Intervention Study. *Am J Clin Nutr*, 2009; 89:1846–56.
- **Saïdi D, Heyman M, Kheroua O, Boudraa G, Bylsma P, Kerroucha R, Chekroun A, Maragi JA, Touhami M, Desjeux JF.** Jejunal response to beta-lactoglobulin in infants with cow's milk allergy. *CR Acad Sci III*, 1995; 318: 683-690.
- **Sanchez C, Frémont S.** Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. *Rev F Allergol Immunol Clin*, 2003; 43: 13-20.
- **Sandra L, Giovanni D, Ginevra L, Ylenia D, Adriana M, Tatiana F, Simone F, Tullio F and Salvatore C.** Allergic proctocolitis refractory to maternal hypoallergenic diet in exclusively breast-fed infants: a clinical observation. *BMC Gastroenterology*, 2011; 11:82.

- **Sathe SK, Teuberb SS, Rouxc KH.** Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotech Adv*, 2005; 23: 423-429.
- **Savilahti E.** Food-induced malabsorption syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 30: 61–6.
- **Savino F, Castagno E, Monti G, et al.** Z-score of weight for age of infants with atopic dermatitis and cow’s milk allergy fed with a rice-hydrolysate formula during the first two years of life. *Acta Paediatr*, 2005; 94:115–9.
- **Sakamoto Y, Ohtsuka T, Yoshida H, Ohto K, Onobori M, Matsumoto T, Likura Y, Morohoshi T.** Time course of changes in the intestinal permeability of food-sensitized rats after oral allergen challenge. *Pediatr Allergy Immunol*, 1998; 9: 20-24.
- **Schmitz J, Garnier-Lengline H.** Diagnostic de la maladie cœliaque en 2008. *Archiv pédiatr*, 2008; 15:456–461.
- **Siala I, Fetni O, Azzabi O, Rebah S. Briki, M. Ben Hariz, A. Maherzi.** Allergie aux protéines du lait de vache: à propos d’une série tunisienne de 43 cas N. *Aliments / Rev Fr Allergol*, 2013; 53: 334–341.
- **Sicherer SH.** Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 108: 881-90
- **Torre S, Oudar A, Coeffier M, Dechelotte P, Letallier R.** Effets de la Glutamine sur la barrière intestinale au cours du stress de privation maternelle néonatale chez le rat. *Nutr Clin Mét*, 2008; 22: 35.
- **Tormo, Cardenas G, Segurola H, Rivero M.** Benefits of a hydrolysed rice protein formula in cow’s milk protein allergy infants. *Clin Nutri*, 2011; 6:198.

- **Tronccone R, Discepolo V.** Colon in food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009; 48: S89–91.
- **Turck D.** Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie. Allaitement maternel : Les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Arch Pédiatr*, 2005; 12:145-165.
- **Turunen S, Karttunen TJ, Kokkonen J.** Lymphoid nodular hyperplasia and cow's milk hypersensitivity in children with chronic constipation. *J Pediatr*, 2004; 145:606–11.
- **Ussing HH, Zerahn K.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 1951; 25: 110-127.
- **Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, et al.** Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child*, 2007; 92: 902–8.
- **Verkarre V, Brousse N.** Le diagnostic histologique de la maladie cœliaque. *Pathol Biol*, 2013; 61:13–19.
- **Vilain A.C.** Qu'est-ce que le lait ? *Rev Fr Allergol*, 2010; 50:124–127.
- **Viola S.** Traitement diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. EMC, Pédiatr, 4-002-H-35, 2012.
- **Von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Grübl A, Wichmann HE, et al.** Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol*, 2007; 119(3):718–25.
- **Von Berg A, Koletzko S, Grubl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, et al.** The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of

life: the german infant nutritional intervention study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111:533–40.

- **Wal JM.** Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 2001; 56: 35-38.
- **Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al.** Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*, 2006; 203:519–27.
- **Xanthakos SA, Schwimmer JB, Melin-Aldana H. et al.** Prevalence and outcome of allergic colitis in healthy infants with rectal bleeding: a prospective cohort study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005; 41:16–22.
- **Yang PC, Berin MC, Yu LCH, Conrad DH, Perdue MH.** Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcεRII). *J Clin Invest*, 2000; 106: 879-886.
- **Yu J, Pেকেles G, Legault L, et al.** Milk allergy and vitamin D deficiency rickets: a common disorder associated with an uncommon disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006; 96: 615–9.
- **Zeece M, Huppertz T, Kelly A.** Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β-lactoglobulin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2008; 9: 62-69.
- **Zeiger RS.** Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics*, 2003; 111:1662-1671.
- **Zellal D.** Effet du traitement combine du chauffage par micro-ondes et du pH sur l'allergénicité des protéines du lait de vache chez la souris Balb/c. Mémoire de Magister, Université d'Oran, 2009; 130 p.

Annexe

Liste des communications et publications

- **Communication orale**

Au séminaire international croissance, alimentation et santé de l'enfant (SICASE) à Constantine 27-29 Avril 2012; thème de la communication: Etude d'une formule à base d'hydrolysats de riz. Merzouk A, Addou S, **Brahim A**, Bouferkas Y, Khéroua O, Saidi D.

- **Présentation (poster)**

- 5^{ème} rencontre scientifique de l'association Tunisienne des Sciences de la Nutrition, 9-10-11 Avril 2010 NABEUL/Tunisie. L'Allergénicité et Antigénicité de la formule lactée extensivement hydrolysée Pepti Junior. **Cherifa Brahim Amina**, S.Addou, O. Kheroua, D. Saidi.
- 5^{ème} congrès francophone d'Allergologie 27-30 Avril 2010 Paris, Palais des Congrès. Etude de l'antigénicité et de l'allergénicité de la formule lactée commerciale extensivement hydrolysée Pepti junior. **A. C. Brahim**, S.Addou, O. Kheroua, D. Saidi.
- 8th NSFA Congress; BIARRITZ, 16-18 juin 2011. Evaluation de l'antigénicité et de l'allergénicité d'une formule lactée extensivement hydrolysée. **Cherifa Brahim Amina**, Samia Addou, Omar Khéroua, Djamel Saidi.
- 11th European Nutrition Conference 26-29 Octobre 2011 Madrid, Spain. Study of the allergenicity of extensively hydrolyzed formula. **Amina Brahim**, Samia Addou, Omar Khéroua, Djamel Saidi.
- Congrès international de Nutrition Oran 22-23 Mai 2011. Etude des propriétés antigéniques et allergéniques d'un lait infantile à base d'hydrolysats de protéines. **Brahim Amina Chérifa**, Addou Samia, Kheroua Omar, Saidi Djamel.

- 1^{er} Séminaire international d'études : Agriculture Biologique et développement durable Oran 12-15 Février 2011. **Brahim Amina Chérifa**, Addou Samia, Kheroua Omar, Saidi Djamel.
- Au 7^{ème} congrès francophone d'allergologie 24-27 Avril 2012 Paris ; thème de la communication : Prise en charge des enfants allergiques aux protéines de lait de vache par une formule infantile à base d'hydrolysate de riz. S. Addou, A. Merzouk, **A. Brahim Chérifa**, D. Saidi, O.Khéroua.
- Au JIB (journées internationales de biologie 2012, 7-8-9 novembre 2012 Paris). Thème de la communication : Etude d'une formule infantile a base d'hydrolysate de riz sur la structure de la muqueuse intestinale. Merzouk A, Addou S, **Brahim A**, Bouferkas Y, Khéroua O, Saidi D.
- Second American Society of Nutrition Middle East Congress ASN, 20-22 Février 2013 Dubai. Interest of the hydrolyzed rice formulae in the coverage of the cow's milk allergy. **A.C. Brahim**, A. Merzoug, S. Addou, O. khéroua, D. Saidi.
- IUNS20th International Congress Of Nutrition Granada Spain. September 15-20 2013. Study of Allergenic Properties of a protein Hydrolysate of rice on the intestinal mucosa of BALB/C mice Immunized with the (β-LG). S. Addou, H. Bessayaih, A. Merzouk, **A. Brahim Chérifa**, O. Khéroua, D. Saidi.
- IUNS20th International Congress Of Nutrition Granada Spain. September 15-20 2013. Protein Determination of an Hydrolyzed Rice-Based Infant Formula in Children Allergic To Cow's Milk Proteins. Addou Samia, Merzouk Amel, **Brahim Amina Chérifa**, Khéroua Omar, Saidi Djamel.

- **Publications internationales**

- **A.C. Brahim** , S. Addou, O. Kheroua, D. Saidi. Study of the Allergenicity of Extensively Hydrolyzed Formula. Revue française d'allergologie 52 (2012) 305–310.
- S. Addou, A. Merzouk, **A. Brahim Chérifa**, D. Saidi, O.Khérroua. Prise en charge des enfants allergiques aux protéines de lait de vache par une formule infantile à base d'hydrolysate de riz. Revue française d'allergologie 52 (2012) 250-254.
- **A. C. Brahim**, S.Addou, O. Kheroua, D. Saidi. Etude de l'antigénicité et de l'allergénicité de la formule lactée commerciale Extensivement hydrolysée Pepti junior. Revue française d'Allergologie 50 (2010) 315-326.
- **A.C. Brahim**, A. Merzoug, S. Addou, O. khérroua, D. Saidi. American Society of Nutrition, 2013 Dubai. Interest of the hydrolyzed rice formulae in the coverage of the cow's milk allergy. http://asn-cdn-remembers.s3.amazonaws.com/2_d_50c15a008609218cbcd56e2b64e989.pdf.
- Samia Addou, **Amina Cherifa Brahim**. Prise en Charge de l'Allergie aux Protéines du Lait de Vache. Editions universitaires européennes. Deutschland/Allemagne; 2014. p. 1-142.
- **Amina cherifa brahim**, Samia addou, Amel merzouk, Omar kheroua, Djamel saidi. Effect of hydrolyzed rice formula on intestinal structure of balb/c mice Immunized with cow's milk proteins. Int J Pharm Pharm Sci, Vol 6, Issue 9, 338-343.
- **Amina cherifa brahim**, Samia addou, Amel merzouk, Omar kheroua, Djamel saidi. Antigenicity of hydrolyzed rice formula in animal model (balb/c mice). Int J Pharm Pharm Sci, Vol 6, Issue 9, 352-354.

Original Article

ANTIGENICITY OF HYDROLYZED RICE FORMULA IN ANIMAL MODEL (BALB/C MICE)

AMINA CHERIFA BRAHIM, SAMIA ADDOU, AMEL MERZOUK, OMAR KHÉROUA, DJAMEL SAIDI

Laboratory of Nutrition physiology and food safety, Department of Biology, Faculty of Science, University of Oran, Algeria
Email: brahimcherifa@gmail.com

Received: 11 Jul 2014 Revised and Accepted: 25 Aug 2014

ABSTRACT

Objective: The hydrolyzed formulas of bovine proteins used in the cow's milk allergy treatment contain peptides which can preserve their allergenicity. These last years, a new preparation with hydrolyzed rice proteins was marketed and could establish a useful alternative in the cases of cow's milk allergy.

The objective of our work is to study the biochemical characteristics of an infantile formula based on hydrolyzed rice and its antigenic effect on the Balb/c mice immunized with α -La protein.

Methods: In our work, we have realized an electrophoresis on polyacrylamide gel to determine various proteins which compose this infantile formula. Lowry's method is used to determine the amount of proteins in the formula. Our work has also allowed us to study the antigenicity of the hydrolyzed rice formula using ELISA method by the use of Balb/c mice serum.

Results: Our results have shown that

- The electrophoresis analysis of the hydrolyzed rice formula has shown the absence of protein bands and consequently the lack of intact proteins in the formula.
- The protein content of the hydrolyzed rice formula is close to the breast milk protein concentration which is adapted to the needs of the infant.
- The hydrolyzed rice formula reacts very weakly with the anti α -La IgG.

Conclusion: The commercial hydrolyzed rice formula can be adapted to cover the needs of the infant. This infantile formula was treated by technological methods to reduce the antigenic potential to prevent Allergy.

Keywords: Infantile Formula, Proteins, Antigenicity, Hydrolyzed rice.

INTRODUCTION

The therapeutic coverage of the cow's milk allergy (CMA) is only dietary. The best therapeutic approach is to exclude all bovine milky proteins [1] and substitute them with either extensively or partially hydrolyzed formula or by preparations with amino acids only.

Recently, cow's milk allergy therapy consists of preparing infant formula by the use of plant ingredients such as hydrolyzed rice and soya. The rice preparation in particular has shown a good tolerance to children suffering from cow's milk allergy and it could constitute a good alternative to the hydrolyzed cow's milk formula [2].

In this work, we are going to study the biochemical characteristics and the antigenicity of an infantile preparation with hydrolyzed rice proteins. We will be using Balb/c mice immunized with alpha-lactalbumin (α -La) protein considered to be the second major protein that causes cow's milk allergy in infants.

MATERIALS AND METHODS

Products

The various products used for the biochemical dosages come from the following companies: ProLabo, Merck and Sigma (France). The pure fractions of proteins: Beta-lactoglobulin (β -Lg), Alpha-lactalbumin (α -La), Bovine Serum Albumin (BSA) and Casein are products of Sigma and Merck (France).

Used samples

Used bovine milk was freshly collected in a farm of bovine breeding in Oran region, Algeria. Unpasteurized milk (pH 6.8) collected is skimmed by centrifugation in 3500 rpm during 15 minutes at 4°C temperature. This operation is intended to eliminate the fat. The skim milk is then freeze-dried by means of a lyophilizer of type speed Vac concentrator 100H.

Used preparation Modilac Expert Rice® is a dietary food intended for medical purposes, especially in case of cow's milk proteins allergy. It is a preparation of hydrolyzed rice proteins 100 % vegetable without cow's milk proteins and without lactose. This product is a part of Modilac® brand of the Sodilac laboratory specialized in the conception and the manufacturing of infantile formulas.

Biochemical characterization of the formula

Protein dosage

For the purpose of protein dosage, Lowry's method was used [3]. In our experiment, various products such as: Folin reagent, washing Soda, hydroxide of Sodium, Tartrate of Potassium and Sodium, Copper Sulphate and bovine serum albumin were used.

The bovine milk and the hydrolyzed rice preparation (Modilac Expert Rice®) protein dosage was performed. A spectrophotometer (Jasco-V530UV/VIS) with a 750 nm wavelength was used to collect data. These results are compared with a standard curve obtained from the Bovine serum albumin.

Electrophoresis

Electrophoresis manipulation was made according to the Laemmli method [4]. Two different composition gels; concentration gel and migration gel were used.

The mixture of proteins is dissolved first in SDS solution; anionic cleaner which breaks almost all the non-covalent bonds in the native molecules. The Mercaptoethanol is also added to reduce the disulfides connections.

The anions of the SDS are bound to the main chains and give the complex SDS-proteins a negative charge. This negative charge acquired by the fixation of the SDS is usually much bigger than the charge of the native protein which becomes unimportant.

The various products and reagent used in the Electrophoresis are: Acrylamide, Bisacrylamide, Temed, Glycerin, Ethanol, Tris, Dodecyl Sodium treated with Copper Sulphate (SDS), Persulfate of ammonium (APS), Acetic acid, Acetic icy, Blue acid of bromophenol, Coomassie Brilliant Blue R250.

Within the framework of this work, the infantile formula as well as the cow's milk are separated in two gels of different concentrations: a concentration gel with 10 % acryl-bisacrylamide and a separation gel with 16,5 % acryl-bisacrylamide. The distorted samples are deposited by means of a Hamilton syringe in wells formed in the upper edge of the concentration gel. The gel is put in a migration solution with an 80 volts voltage difference for two hours. After migration, the gel is transferred in a solution containing the Coomassie Brilliant Blue R250 to reveal the various bands representing various proteins. The gel is then put in a discoloration solution.

Antigenicity study

Animals

The animals used in our protocols are female mice Balb/c obtained from the Pasteur Institute in Algiers (Algeria). These are mice bred and acclimatized before handling in the laboratory of Nutrition Physiology and Food Safety of the University of Oran. The housing conditions are in accordance with state mandated regulations. The experiments are carried out with the well-being of the animal; all stress and agitation to the mice is avoided.

Immunization of the animal model

40 female Balb/c mice, 4 weeks old and weighting of (19.50 ± 0.25) g, are used for the immunization protocol and distributed as follow:

Group1: 20 mice immunized with native α -La protein.

Group2: 20 mice receiving no treatment (control group).

Mice are immunized intra-peritoneally. Each mouse has received a dose of 100 μ L of PBS pH 7.4 containing 10 μ g of α -La mixed with 2 mg of Aluminum hydroxide $Al(OH)_3$. Intra-peritoneal injections take place on the day 1 than under the same conditions on the 14th, 21st and 28th days of the protocol.

Blood collection

Before handling the animal, a first retro-orbital blood sample is taken using a Pasteur pipette. This is repeated at Day 35 before sacrifice. An average volume of 400 to 500 μ l of blood per mouse is collected. The blood is then centrifuged at 3500 rpm for 15 min at 4° C to separate the serum which is then collected into Eppendorf micro tubes and preserved at -20°C.

Study of the reactivity of infantile formula

The antigenicity of the infantile preparation is measured by the study of its reactivity using specific anti α -La IgG (obtained from Balb/c serum). The method used is a non-competitive process by the ELISA method (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Statistical methods

The results are expressed as mean \pm standard error ($X \pm SE$). The averages were compared using a Student test for paired data and unpaired. Statistical analysis was conducted using a statistical software program named STATISTICA (5.1.2006). Analysis of variance was performed with the ANOVA test. The significance level used is 5%.

RESULTS

Dosage of total proteins by Lowry's method

The protein dosage is realized on the skimmed cow's milk and on the infantile preparation with hydrolyzed rice protein (n=6) with n representing the number of samples. The results of the dosage are presented in the (Figure 1). The obtained results show that the content in proteins of the cow's milk is (30.98 ± 1.77) g/l. The content in total proteins of the preparation with hydrolyzed rice proteins is (13.71 ± 0.43) g/l.

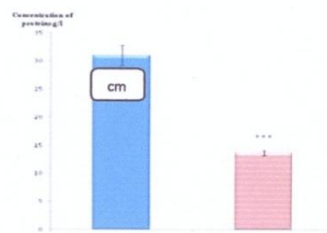


Fig. 1: Proteins content of the cow's milk and the hydrolyzed rice formula.

CM: Cow's milk, HR: Hydrolyzed rice formula, ***p< 0.001

Electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of SDS

The realized gel is illustrated in the (Figure 2). The first well corresponds to a marker kit constituted by a mixture of pure bovine proteins, containing BSA (68000 Da), casein (24000 Da), β -Lg (18000 Da) and α -La (14000 Da). The second well of the gel contains cow's milk, showing clearly the existence of various protein bands comparable to reference proteins. The analysis of the deposit of the rice formula in the third well shows the absence of intact proteins. The fourth well corresponds to a marker kit constituted by a mixture of peptides of low molecular weight of Sigma reference.

Study of the antigenicity

Serum titers of anti α -La antibodies of Balb/c mice immunized with α -La

The revelation of specific anti α -La IgG is performed by ELISA in sera from Balb/c mice sensitized to α -La (n = 20). This is a very sensitive technique to quantify accurately IgG [5]. 35 days after immunization, serum titer of anti α -La IgG is detectable in the sera of mice. These antibodies are produced at a significantly higher rate, reaching 1/100000th, which is highly significant (p <0.001) (Figure 3).

Reactivity of Modilac Expert Rice®

The results obtained show that the hydrolyzed rice formula (Modilac Expert Rice®) reacts very weakly with anti α -La IgG. The values are significantly lower than those obtained with the α -La (pure fraction) reaching 1/100th (p <0.001) (Figure 3).

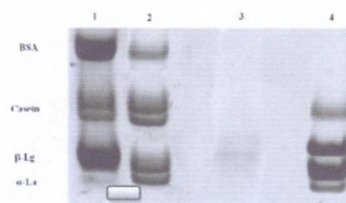


Fig. 2: Electrophoresis on polyacrylamide-SDS gel of the cow's milk and the hydrolyzed rice formula.

1. Reference Proteins containing: BSA (68000 Da), Casein (24000 Da), β -Lg (18 000 Da) and α -La (14000 Da).

2. Cow's milk.

3. Preparation with hydrolyzed rice proteins (Modilac Expert Rice®).

4. Kit of peptide reference containing: Triose Phosphate Isomerase (Rabbit Muscle): 26600 Da, Myoglobine (Horse Heart): 17000 Da, α -

lactalbumine (Bovine Milk): 14200 Da, Aprotinine (Bovin Lung): 6500 Da.

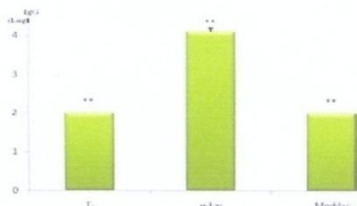


Fig. 3: Reactivity of α -La and hydrolyzed rice formula (Modilac Expert Rice®) with anti α -La IgG.

The reported values are averages and standard errors. T: Negative Control, α -Lac: reactivity of the protein α -La (pure fraction) with anti α -La IgG. Modilac: reactivity of hydrolyzed rice formula with anti α -La IgG. ** $p < 0.01$

DISCUSSION

Approximately 2% of newborns exhibit hypersensitivity to cow's milk in the first year of life [6]. The Guidelines for the dietary management of infants diagnosed with allergy to cow's milk protein (CMP) recommend substitution of the cow's milk formula by extensively hydrolyzed formulas based on CMP, modified soy protein formulas and, in certain cases, amino acid-based formulas [7]. It is hypothesized that removing antigens such as bovine serum albumin (BSA), caseins, α -lactalbumin (α -La), and β -lactoglobulin (β -Lg) from cow's milk is the best way to reduce antigenicity. The enzymatic degradation of whey protein is widely utilized in the food industry as a way to reduce milk protein antigenicity [8]. During these last years a formula with rice proteins is marketed. It could constitute a good alternative to preparations with cow's milk proteins. However, few studies were performed to confirm their efficiency [9]. In the first step of our work, an approach on the biochemical characterization of hydrolyzed rice proteins (Modilac Expert rice®) was done. After performing the protein dosage of the hydrolyzed rice protein formula, we have obtained results that coincide to those mentioned on the labeling by the industry. This content in proteins is close to the protein concentration of the maternal milk included between (12 - 14) g/l and is sharply lower than that of the other mammals [10]. This concentration is adapted to the nutritional needs of infant. The content in proteins of the cow's milk confirms the previous results [11]. The electrophoresis on polyacrylamide gel was realized to identify various proteins which compose the preparation with hydrolyzed rice proteins (Modilac Expert rice®).

The electrophoretic profile of cow's milk reveals different protein bands (Casein, BSA, β -Lg, α -La), while no band is detected in the electrophoretic profile of the rice protein preparation. Our results confirm the literature and show that the rice formula does not contain any complete proteins in order to reduce the antigenic and allergenic potential of the formula. Changes in allergenic activity during food processing are attributable to inactivation or destruction of epitope structures, new epitopes formation, or improved access of previously hidden epitopes. The allergenic potency of food could be altered by several food manufacturing processes, such as mechanical, purification, thermal, biochemical, and chemical processes [12]. In the second step, the antigenicity of infantile formula (Modilac Expert Rice®) was measured. For this study, we have used IgG antibodies directed against the α -La protein obtained by using the parenteral way of sensitization of Balb/c mice. Our results clearly show the development of hypersensitivity against the antigen administered (α -La). These results are similar to those obtained in work of Frossard et al. [13] where anaphylactic mice immunized with α -La exhibit a sharp increase in antibody titers IgG1 anti α -La and an increase in production of IL4.

The antigenicity encompasses both the ability to be recognized and bind to specific antibodies predominantly of the IgG class [14]. This is why the measure of the antigenicity of the hydrolyzed rice formula is studied using the antibody anti α -La IgG. Our results show that there was a very low reactivity of hydrolyzed rice formula with the anti α -La IgG. The findings in the study of Giorgio et al. [15] suggest that this new formula based on hydrolyzed rice proteins has a very low sensitizing capability. Hydrolyzed rice formula has proven to be safe when tested by double-blind, placebo-controlled food challenge in a study population of 18 children allergic both to cow's milk (CM) and soy protein [16]. This formula is a good alternative not only for children with multiple allergies but also for children allergic to cow's milk [17].

CONCLUSION

Infantile rice formula is a completely vegetable formula. It has no similar proteins as the major allergenic proteins found in cow's milk that cause cow's milk allergy. The proteins in the rice formula are designed and implemented in order to avoid the epitope similarity with the cow's milk and to reduce the antigenic and allergenic potential.

CONFLICTS OF INTEREST

There were no conflicts of interest in the accomplishment of this research.

REFERENCES

- Viola S, Sarrio F. Traitement diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. *EMC Pédiatr* 2004;1:335-40.
- Dupont C, Chouraqui JP, De Boissieu D, Bocquet A, Bresson JL, Briand A, et al. Prise en charge diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. *Archiv Pédiatr* 2011;18:79-94.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:193-251.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* 1970;227:680-5.
- Catherine J, Eric B. Techniques ELISA en auto-immunité. *GEAL L'INFO: Numéro Spécial*; 2005.p. 10-2.
- Hosking CS, Heine RG, Hill DJ. The Melbourne milk allergy study—two decades of clinical research. *Allergy Clin Immunol Int J World Allergy Org* 2000;12:198-205.
- Reche M, Pascual C, Fiandor A, Polanco I, Rivero-Urgell M, Chifre R, et al. The effect of a partially hydrolyzed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:577-85.
- Nilantha L, Yoichi T, Shinjiro T, Hirohide T, Toki T, Masaaki Y. Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*. *Pro Biochemistry* 2011;46:806-10.
- Girardet JP. Hydrolysats de riz une alternative thérapeutique intéressante? *Réalit Pédiatr* 2010;152:cahier1.
- Turck D. Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie. Allaitement maternel: Les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Arch pédiatr* 2005;12:145-65.
- Vilain AC. Qu'est-ce que le lait? *Rev F Allergol* 2010;50:124-7.
- Angelika P, Matthias B. Stability of bovine allergens during food processing. *Annals of Allergy. Asthma and Immunol* 2002;89:16-20.
- Frossard P, Tropia L, Hauser C, Eigenmann P. Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:958-64.
- Wal J. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001;56:35-8.
- Giorgio I, Piacentini, Lucia V, Alessandro B, Paola M, Diego G, et al. Allergenicity of a hydrolyzed rice infant formula in a guinea pig model. *Annals of Allergy. Asthma Immunol* 2003;91:161-64.
- Luigi T, Patrizia I, Sergio A, Alexa Z, Alberto M. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy. *Annals of Allergy. Asthma Immunol* 2002; 89:86-90.
- Fiocchi A, Restani P, Bernardini R. A hydrolyzed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2006;36:311-6.

Original Article

EFFECT OF HYDROLYZED RICE FORMULA ON INTESTINAL STRUCTURE OF BALB/C MICE
IMMUNIZED WITH COW'S MILK PROTEINS

AMINA CHERIFA BRAHIM, SAMIA ADDOU, AMEL MERZOUK, OMAR KHÉROUA, DJAMEL SAIDI

Laboratory of Nutrition Physiology and Food Safety, Department of Biology, Faculty of Science, University of Oran, Algeria.
Email: brahimcherifa@gmail.com

Received: 19 Jun 2014 Revised and Accepted: 25 Aug 2014

ABSTRACT

Objective: In the last few years a new preparation with hydrolyzed rice proteins was introduced and marketed as a useful alternative in the cases of cow's milk allergy.

The objective of our work is to study the consequences of hydrolyzed rice formula on the structure of the intestinal epithelium.

Methods: For the histological study, we have used 4 weeks old 60 female mice Balb/c, weighting (19.50 ± 0.25) g and distributed as follow:

- Group 1A: 10 mice receiving hydrolyzed rice formula for a period of 28 days after being immunized with native β -Lg.
- Group 1B: 10 mice continue receiving a standard feed for a period of 28 days after being immunized with native β -Lg (Positive control).
- Group 2C: 10 mice receiving hydrolyzed rice formula for a period of 28 days after being immunized with α -La protein.
- Group 2D: 10 mice continue receiving a standard feed for a period of 28 days after being immunized with α -La protein (Positive control).
- Group 3: 20 mice receiving just a standard feed with no treatment (Negative control).

Results: The weight growth of all the experimental groups increases gradually with time, but the consumption of the hydrolyzed rice proteins causes a decrease of the degree of evolution of the physical weight to mice fed with this infantile formula compared with control groups. It also causes an increase of the intestinal villi height at the structure level of the intestinal mucous membrane of mice fed with hydrolyzed rice proteins compared to the positive control groups. The lymphocytic infiltration of mice fed with hydrolyzed rice proteins is similar to the one in negative control group.

Conclusion: The preliminary results show that the hydrolyzed rice formula is a possible alternative to the cow's milk formula in case of allergy. Further studies are needed to prove its nutritional efficacy.

Keywords: Mice, Intestinal epithelium, Vegetable proteins, Hydrolysates of rice.

INTRODUCTION

The prevalence of allergy to cow's milk proteins (CMPA) varies between 0.1 and 7.5% in general population [1]. Allergy to cow's milk proteins is defined by the occurrence of clinical disease caused by an abnormal immune response after ingestion of these proteins [2].

Digestive biopsies may show intestinal lesions with frequent villous atrophy. An infiltrate of eosinophils can be present in the case of allergic phenomenon causing these lesions [3].

Hydrolyzed rice formula recently available in the market was investigated as a possible alternative for children allergic to cow's milk proteins. The objective of our work is to verify the consequences of hydrolyzed rice formula on the structure of the intestinal mucosa, particularly at the villous architecture and the composition of intra-epithelial lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Products and reagents

The various products used in our work come from Prolabo, Merck and Sigma (France).

Used formula

The used preparation Modilac Expert Rice® is a dietary food intended for medical purposes, especially in case of cow's milk proteins allergy. It is a preparation of hydrolyzed rice proteins 100 % vegetable without proteins of cow's milk and without lactose (table 1). This product is a part of Modilac brand of the Sodilac laboratory specialized in the conception and the manufacturing of infantile formulas.

Histological Study

The aim of this study is to verify if there are changes in the histological structure of the intestinal mucosa, especially at the jejunal villous architecture and composition in intraepithelial lymphocytes of mice treated with hydrolyzed rice formula compared to control groups.

Distribution of animals

The animals used in our protocols are female mice Balb/c obtained from the Pasteur Institute in Algiers (Algeria). These are mice bred and acclimatized before handling in the laboratory of Nutrition Physiology and Food Safety in housing conditions in accordance with regulations. The experiments are carried out according to the well-being of the animal, avoiding the stress and agitation may interfere with the results.

60 female Balb/c, 4 weeks old and weighing of (19.50 ± 0.25)g were divided into 5 experimental groups:

- Group 1A: 10 mice receiving hydrolyzed rice formula for a period of 28 days after being immunized with native Beta-lactoglobulin (β -Lg).
- Group 1B: 10 mice continue receiving a standard feed (table 2) for a period of 28 days after being immunized with native β -Lg (Positive control).
- Group 2C: 10 mice receiving hydrolyzed rice formula for a period of 28 days after being immunized with Alpha-lactalbumin (α -La).
- Group 2D: 10 mice continue receiving a standard feed for a period of 28 days after being immunized with α -La protein (Positive control).
- Group 3: 20 mice receiving just a standard feed with no treatment (Negative control).

Immunization protocol

The mice of groups 1A, 1B, 2C, 2D were immunized intraperitoneally. Each mouse has received a dose of 100 µl of PBS pH 7.4

containing 10 µg of α-La or β-Lg, mixed with 2 mg of Aluminum hydroxide Al(OH)₃. Intra-peritoneal injections take place on the day 1 then under the same conditions on the 14th, 21st and 28th days of the protocol.

Table 1: The composition of Modilac Expert Rice® formula

Average analysis per 100 ml	Modilac Expert Rice®
Presentation Box	800 g
Energy kcal	68
Proteins g	1,6
Carbohydrates g	7,6
Lactose g	Without
Maltodextrin g	6
Starches Corn g	1,6
Lipids g	3,4
Linoleic acid mg	444
α-linolenic acid mg	38
Arachidonic acid mg	No
Docosahexaenoïque acid mg	No
Medium chain triglycerides g	0,7
Calcium mg	61
Phosphorus mg	34
Iron mg	0,7
Measure g	4,5
Reconstitution	13,5%
Osmolarity mOsmol/L	200

Table 2: Composition of the standard diet

Analytical constituents	Percentage %		
Raw materials	23		
Fat	0,43		
Cellulose	4		
Humidity	12		
Ashes	5,5		
Ash insoluble in HCl	2		
→ Mineral Composition			
Minerals	mg/kg	Minerals	mg/kg
Phosphorus	5900	Manganese	90
Calcium	3300	Iron	240
Sodium	1900	Copper	30
Potassium	6700	Zinc	83
Magnesium	2000	Iodine	3
→ Vitamins			
Vitamins	mg/kg	Vitamins	mg/kg
Vit A	7500 UI/kg	Vit PP	75
Vit D3	1500 UI/kg	Vit E	30
Vit B1	7	Vit K3	2,5
Vit B2	6,5	Folic Acid	0,5
Vit B3	16,5	Choline	1600

After immunization, animals of 1A and 2C groups received a hydrolyzed rice formula for 28 days.

Measurement of weight gain

The individual body weight of all animals was measured weekly during the experiment.

Treatment of samples

Intestinal biopsies are done on day 63 for each group of mice. Our slides were stained with haematoxylin-eosin [4].

Measurement of intestinal villi

The measurement of villus height is an essential criterion providing information on the existence of any villous atrophy in mice.

Measurements of the heights are made under an optical microscope with an ocular micrometer on jejunal fragments of different experimental groups.

Count of intraepithelial lymphocytes (IEL)

For each tissue, three counting are done. These counts are made on 100 enterocytes. Counting is made on intestine fragments of different groups of mice.

Statistical methods

The results are expressed as mean ± standard error (X ± SE). The averages were compared using a Student test for paired data and

unpaired. Statistical analysis was conducted using a statistical software program STATISTICA (5.1.2006).

Analysis of variance was performed with the ANOVA test. The significance level used is 5%.

RESULTS

Effect of the hydrolyzed rice formula on weight gain

In this work, we have evaluated the consequences of consuming hydrolyzed rice formula on the evolution of mice body weight (Figure 1, Figure 2).

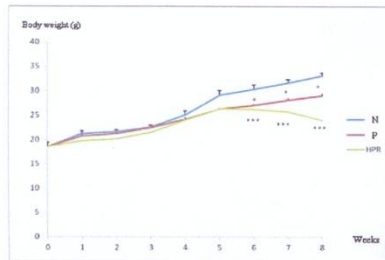


Fig. 1: Weight gain of mice immunized with the β-Lg and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

*p<0,05, ***p< 0,001., N: Negative control., P: Positive control., HPR: Mice immunized with the β-Lg and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

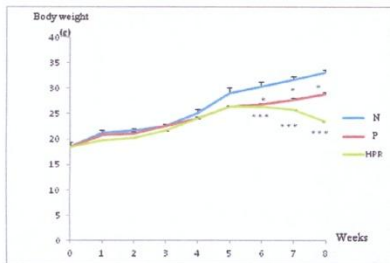


Fig. 2: Weight gain of mice immunized with α-La and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

*p<0,05, ***p< 0,001., N: Negative control., P: Positive control., HPR: Mice immunized with α-La and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

Histological Study

Histology of the intestinal mucosa of negative control group

Negative controls are mice receiving a standard feed and water during the 63 days of experimentation with no treatment. Under an optical microscope, the intestinal mucosa of negative control group reveals a regular appearance with formation of numerous projections; it is a villi separated by communicating grooves (Figure 3).

Histology of the intestinal mucosa of Positive control groups

Positive control groups are mice that continue receiving a standard feed and water after being immunized with the native β-Lg or α-La.

The intestinal mucosa of positive control mice has a very pronounced atrophy, characterized by flattened villi limited by a pseudo-stratified epithelium with dystrophic nucleus cubic cells. At

the Lamina propria level, the inflammation is very pronounced (Figure 4, Figure 5).

Histology of the intestinal mucosa of mice fed with hydrolyzed rice formula

The appearance of the intestinal mucosa of mice fed with hydrolyzed rice formula indicates an improvement in the structure of the intestinal mucosa compared to the positive control groups. The villi are increasingly thin and long, limited by a simple cylindrical epithelium, formed with high striated cells with regular basal nuclei that corresponds to the enterocytes (Figure 6, Figure 7).

The lamina propria appears fibrous and polymorphic with various mononuclear elements which correspond to the immune system cells (lymphocytes). The villous height indicates a highly significant difference compared with the positive control groups.

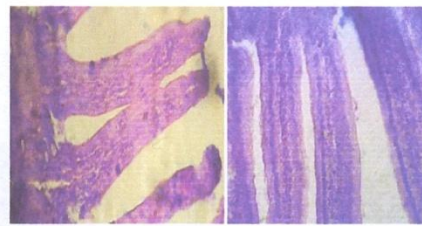
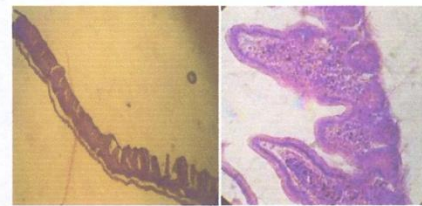


Fig. 3: Microscopic observations G (10 x 40) of intestinal biopsies of the negative control group.

The intestinal mucosa is formed with many projections in glove fingers: they are villous separated by the inter villous communicating grooves.



G (10x10) G (10 x 40)

Fig. 4: Microscopic observations of intestinal biopsies of positive control group: mice immunized with the β-Lg.

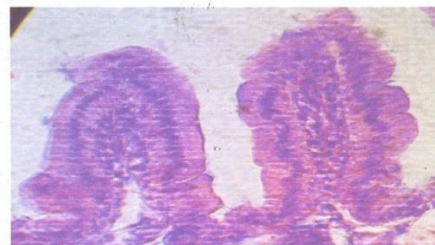


Fig. 5: Microscopic observation G (10 x 40) of intestinal biopsy of positive control mouse immunized with α-La.

Intestinal villi are shortened, deformed and expanded; they are bordered by a stratified epithelium. The lymphocytic infiltration in the lamina propria is dense.

The intestinal mucosa of positive control group has a very pronounced atrophy. It is characterized by flattened villi limited by a pseudo-stratified epithelium having dystrophic nucleus cubic cells. At the Lamina propria level, the inflammation is very pronounced.

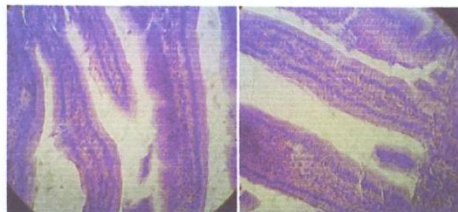


Fig. 6: Microscopic observations G (10 x 40) of intestinal biopsies of mice immunized with β -Lg then fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

Intestinal villi are comparable to the ones in negative control group. There is no lymphocytic infiltration.

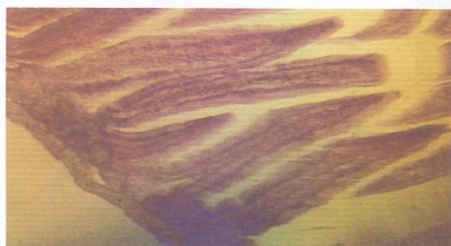


Fig. 7: Microscopic observation G (10 x 40) of intestinal biopsy of mouse immunized with α -La then fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

The villi are increasingly thin and long, bordered by a simple cylindrical epithelium, which is formed with high striated cells corresponding to enterocytes.

Evaluation of intestinal villous height of mice fed with hydrolyzed rice formula

The villous heights of negative and positive control groups are respectively $48.00 \pm 1.06 \mu\text{m}$ and $5.12 \pm 0.50 \mu\text{m}$ with $p < 0.001$. In experimental groups, the consumption of hydrolyzed rice formula does not cause villous atrophy compared with the positive control groups. We have obtained an average villous height of $21.50 \pm 2.04 \mu\text{m}$ for the group immunized with β -Lg and $20.86 \pm 1.76 \mu\text{m}$ for the group immunized with α -La (Figure 8, Figure 9).

Count of intraepithelial lymphocytes (I. E. L)

The counting of intraepithelial lymphocytes allows to compare their numbers in the different samples of intestine. A high number of intraepithelial lymphocytes is a sign of inflammation. The lymphocyte count is estimated as a percentage (%) in different jejunal fragments and compared to the negative control.

The number of intraepithelial lymphocytes of positive control groups (1B and 2D) is highly elevated compared to negative control. We note that the number of intraepithelial lymphocytes of mice immunized with the β -Lg and α -La having consumed the hydrolyzed rice proteins is similar to the negative control group, with a difference of 0.6% for the group immunized with β -Lg and 0.4% for the group immunized with α -La (Figure 10, Figure 11).

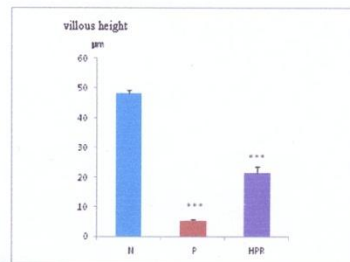


Fig. 8: Evaluation of the villous height in mice immunized with the β -Lg and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

*** $p < 0,001$, N: Negative control, P: Positive control, HPR: Mice fed with hydrolyzed rice formula.

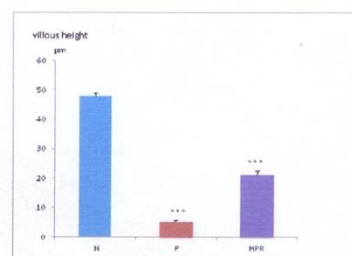


Fig. 9: Evaluation of the villous height in mice immunized with α -La and fed with hydrolyzed rice formula for 28 days.

*** $p < 0,001$, N: Negative control, P: Positive control, HPR: Mice fed with hydrolyzed rice formula.

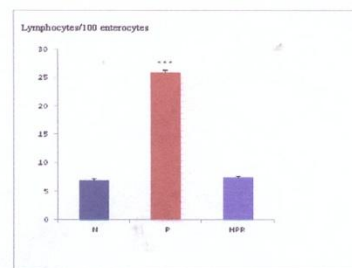


Fig. 10: Effect of hydrolyzed rice formula on the number of intraepithelial lymphocytes of the intestinal villi of mice immunized with β -Lg.

*** $p < 0,001$, N: Negative control, P: positive control, HPR: Mice fed with hydrolyzed rice formula.

DISCUSSION

The treatment of cow's milk allergy is to replace the infantile formula, cow's milk and all milk derived products by alternative substitutes. Until recently, the only cow's milk substitutes were limited to extensive hydrolysates and preparations based on amino acids [5]. The use of soy protein preparations is discouraged because of their phytoestrogen content [6].

New data have recently led to modify the treatment of cow's milk allergy. Preparations made from hydrolyzed rice protein (HRP) have been developed with a composition in accordance with the 2006 Directive [7]. The rice is a little allergenic cereal and naturally devoid of phytoestrogens [8]. Hydrolyzed rice formulas are an alternative to animal hydrolysates. However, some researchers have found that the composition of vegetable drinks is not adapted to the needs of infants and represent a major danger [9]. Over the past 20 years, several cases of kwashiorkor syndrome affected infants fed with rice drinks [10]. Formulas with rice or almond are not adapted for infant growth and the allergenic risk for children already allergic to certain foods has not been evaluated yet [11].

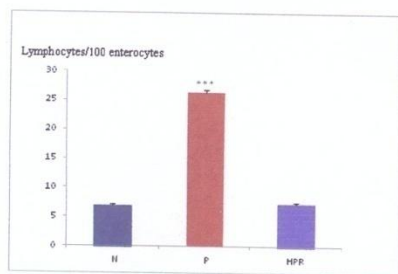


Fig. 11: Effect of hydrolyzed rice formula on the number of intraepithelial lymphocytes of the intestinal villi of mice immunized with α -La.

*** $p < 0,001$, N: Negative control, P: Positive control, HPR: Mice fed with hydrolyzed rice formula.

In our work, we have evaluated the consequences of consuming hydrolyzed rice formula on the evolution of body weight in mice immunized with the β -Lg and α -La and having consumed hydrolyzed rice formula for 28 days.

Our results show a progressive increase in body weight in both experimental groups. However, a decrease in evolution of body weight compared to control mice was observed from the 6th week which is probably due to the fact that infant formula is deficient in essential amino acids.

Lasekan et al. reported that growth retardation was observed in infants and children fed with rice formula [12]. Another Italian controlled study evaluated the growth of 58 infants allergic to cow's milk proteins, receiving either a soy preparation, extensive hydrolyzate of cow's milk proteins or hydrolyzed rice proteins. The results were compared with the values of a control group consisting of 30 non-allergic children receiving a normal diet. Children had a mean age of three months and were followed for two years. No observed difference of weight gain between the three allergic children groups. However, slightly but significantly lower values were observed transiently, between 9 and 18 months in the hydrolyzed rice proteins group compared with the control group [13].

A similar study was done on 93 infants allergic to cow's milk proteins. They were followed between 6 and 12 months. The results showed no differences in the values of Z-scores of weight-age, height-age, and weight-height between infants fed hydrolyzed rice proteins, fed with an extensive hydrolyzed cow's milk proteins or fed a soy protein preparation respectively. In these three groups, the growth was also identical with a control group consisting of breastfed children [14].

Other studies were carried out on groups of children to evaluate the nutritional efficiency of rice hydrolysates. Different groups of allergic children to cow's milk proteins receiving a rice or soy preparation were compared with a control group consisting of non-allergic children receiving a normal diet. These groups of children aged of 3 months were followed for 2 years. The results showed that

the weight growth of the different groups was similar and no significant difference were observed [15].

A similar study was performed by Agostini et al. [16], using the hydrolyzed cow's milk proteins, rice proteins, and soy proteins. The control group was formed by breastfed children. The results showed no difference in weight gain between the control group and the groups receiving hydrolyzed cow's milk proteins and those receiving hydrolyzed rice protein and hydrolyzed soy protein. Infants fed hydrolyzed rice formula have a satisfactory growth and tolerance [17].

When the allergic child has chronic gastrointestinal symptoms, the search for eosinophils and their counts in the gastrointestinal mucosa must be undertaken when endoscopy is performed. The morphometric analysis of small intestine biopsies is also important to look for villous atrophy [18].

Histological study in this work has indicated an improvement in the structure of the intestinal mucosa of immunized mice fed with hydrolyzed rice formula for 28 days with a highly significant increase in villous height, and a similar lymphocytic infiltration to the negative control group. In contrast to the positive control groups, they present a considerable change in the structure of the intestinal mucosa, with a pronounced villous atrophy and lymphocytic infiltration. These results agree with those obtained by Addou et al. [19].

The results suggest that the hydrolyzed rice formula is a good alternative for cow's milk allergy. However soy formulas does not prevent allergy and soy proteins are also antigenic as cow's milk proteins. Several findings report the occurrence of enteropathy with villous atrophy similar to those reported with allergies to cow's milk protein [20]. The hydrolyzed rice formula is a new alternative to standard formulas based on cow's milk and soy [21].

A study of tolerance of rice hydrolyzate enriched with lysine and threonine was done on 3 years old children. The study included 99 allergic children to cow's milk proteins [22]. The patients often had IgE anti-rice protein in their serum, but only 6 of them have responses to the hydrolyzate included in the preparation used in treatment of cow's milk allergy. According to the work of Girardet et al. [23], it was shown that the study of hydrolyzed rice formula showed a good tolerance in 90% of children allergic to cow's milk proteins.

CONCLUSION

The preliminary results show that the hydrolyzed rice formula is a possible alternative to the cow's milk formula in case of allergy. Further studies are needed to prove its nutritional efficacy. Reducing the allergenicity of an infant formula is not enough, we must also ensure that the formula must provide the necessary growth and development to a child.

CONFLICTS OF INTEREST: NO

REFERENCES

- Rancé F, Dutau G. Actualités sur l'exploration et la prise en charge de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *Rev Fr Allergol* 2009;49:S28-33.
- Dupont C, Chouraqui JP, De Boissieu D, et al. Prise en charge diététique de l'allergie aux protéines du lait de vache. *Arch Pédiatr* 2011;18:79-94.
- De Boissieu D, Dupont C. Allergie au lait de vache IgE-médiée. *Arch Pédiatr* 2006;13:1283-4.
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. New York: Churchill Livingstone; 2002.
- Bhatia J, Greer F. American academy of Pediatrics committee on nutrition. Use of soy-protein based formulas in infant feeding. *J Pediatr* 2008;121:1062-8.
- Nutrition Committee of the French Society of Pediatrics. Phytoestrogènes et aliments à base de soja chez le nourrisson et l'enfant: la prudence est de mise. *Arch Pédiatr* 2006;13:1091-3.
- Meister E, Ellnain M, Gieseler H, Aaps. Collapse temperature measurement by freeze-dry microscopy and transferability to freeze drying processes: influence of solute concentration on

- collapse behavior and effect on cycle design. Meeting and Exposition Oct 29-Nov San Antonio Texas USA 2006;2.
8. Koo W, Lasekan JB. Rice protein-based infant formula: current status and future development. *Minerva Pediatr* 2007;59:35-41.
 9. Elbez A. Des « laits » qui n'en sont pas. *Med Enf* 2006;26:103-8.
 10. Massa G, Vanoppen A, Gillis P, Aerssens P, Alliet P, Raes M. Protein malnutrition due to replacement of milk by rice drink. *Eur J Pediatr* 2001;160:382-4.
 11. Dupont C, Boissieu D. Aliments et dermatite atopique. *Rev Fr Allergol* 2005;45:114-26.
 12. Lasekan JB, Koo WK, Walters J. Growth, tolerance and biochemical measures in healthy infants fed a partially hydrolyzed rice protein-based formula: a randomized, blinded, prospective trial. *J Am Coll Nutr* 2006;25:12-9.
 13. Savino F, Castagno E, Monti G, et al. Z-score of weight for age of infants with atopic dermatitis and cow's milk allergy fed with a rice-hydrolysate formula during the first two years of life. *Acta Pediatr* 2005;94:115-9.
 14. Agostoni C, Fiocchi A, Riva E, et al. Growth of infants with IgE-mediated cow's milk allergy fed different formulas in the complementary feeding period. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:599-606.
 15. D'Auria E, Sala M, Lodi F. Nutritional value of a rice-hydrolysate formula in infants with cow's milk protein allergy: a randomized pilot study. *J Int Med Res* 2003;31:215-22.
 16. Agostini C, Axelsson I, Goulet O. Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:352-61.
 17. Reche M, Pascual C, Fiandor. The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:577-85.
 18. Dupont C. Allergies alimentaires: diagnostic, suivi et traitement. *Rev Fr Lab* 2012;19-22.
 19. Addou S, Tomé D, Kheroua O, et al. Parenteral immunization to β -lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit. *Inter Immunophar* 2004;4:1559-63.
 20. ESPGHAN COMITÉ DE NUTRITION. formules de protéine de soja pour nourrissons et sur les formules: un commentaire par le Comité sur la nutrition ESPGHAN. *Gastroenterol Nutr J Pediatr* 2006;42:352-61.
 21. Fiocchi A, Travaini M, D'Auria E. Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1576-80.
 22. Fiocchi A, Restani P, Bernardini R. A hydrolyzed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multi-centre study. *Clin Exp Allergy* 2006;36:311.
 23. Girardet JP, Rivero M, Orbezo J, et al. Tolérance d'une formule infantile de protéines de riz hydrolysées. *Arch Pédiatr* 2010;17:1-178.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Article original

Étude de l'allergénicité d'un lait extensivement hydrolysé

Study of the allergenicity of extensively hydrolyzed formula

A.C. Brahim^{*}, S. Addou, O. Kheroua, D. Saidi

Laboratoire de physiologie de la nutrition et sécurité alimentaire, département de biologie, faculté des sciences, université d'Oran, bâtiment principal,
1^{er} étage, porte N° 68, Oran, Algérie

Reçu le 26 avril 2011 ; accepté le 12 août 2011
Disponible sur Internet le 16 septembre 2011

Résumé

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) toucherait 3 à 6 % des enfants de moins de deux ans. Lorsque l'allaitement doit être interrompu, on fait appel à des substituts. Trois types de produits à antigénicité réduite doivent être distingués selon le degré d'hydrolyse, des formules partiellement hydrolysées (HA), extensivement hydrolysées, à base d'acides aminés. La potentialité d'un produit à prévenir ou traiter l'allergie ne peut être déterminée que par des études cliniques randomisées ayant une méthodologie correcte.

Bui de l'étude. – Étudier l'allergénicité d'un lait extensivement hydrolysé in vitro en chambre de Ussing, à partir d'un modèle animal (souris Balb/c) sensibilisé avec la protéine allergisante majeure du lait de vache la β -lactoglobuline (β -Lg).

Matériels et méthodes. – Soixante souris femelles Balb/c ($22,50 \pm 0,27$ g) sont utilisées, 48 souris immunisées avec la (β -Lg) native et 12 souris femelles Balb/c ne recevant aucun traitement (témoin). Des échantillons d'un lait extensivement hydrolysé, d'un lait standard infantile « premier âge » et d'un lactosérum bovin natif utilisés dans cette étude sont caractérisés sur le plan biochimique par un dosage des protéines totales par la méthode de Lowry. L'allergénicité des laits est étudiée, en chambre de Ussing, par des tests de provocation effectués sur des fragments jéjunaux de souris Balb/c sensibilisées par voie intra péritonéale à la β -lactoglobuline (β -Lg).

Résultats. – Les résultats obtenus montrent que la teneur en protéines des deux laits infantiles est comparable à celle du lait maternel. Sur le plan de l'allergénicité, le lait extensivement hydrolysé stimule significativement le courant de court-circuit (I_{sc}), cette réaction est comparable à celle obtenue avec la protéine sensibilisante (β -Lg), le lactosérum bovin natif, et le lait infantile standard. Ces résultats suggèrent l'existence d'une réaction anaphylactique locale due à l'interaction directe de l'antigène sensibilisant avec les muqueuses des fragments jéjunaux.

Conclusion. – Les peptides de faibles poids moléculaires du lait extensivement hydrolysé sont dotés d'un pouvoir allergénique chez les souris Balb/c.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Hydrolysats de protéines ; Préparations infantiles ; β -Lg ; Formules lactées ; Allergénicité des hydrolysats ; Lait maternel

Abstract

The cow's milk allergy touches 3 to 6% of the children less than two years. When the feeding must be interrupted, we appeal to substitutes. Three types of products in reduced antigenicity must be distinguished according to the degree of hydrolysis, partially hydrolyzed formulae, extensively hydrolyzed, with amino acids. The potentiality of a product to prevent or treat the allergy can be determined, by clinical randomized studies having a correct methodology.

Aim of work. – Study of the allergenicity of the extensively hydrolyzed formula in vitro (Ussing chamber), from an animal model (Balb/c) mice, made sensitive with the major allergenic protein of cow's milk (β -Lg).

Materials and methods. – Sixty female mice Balb/c ($22,50 \pm 0,27$ g), 48 mice immunized with native (β -Lg) and 12 female mice Balb/c receiving no treatment.

Samples from, extensively hydrolyzed formula, standard formula "first age" and native bovine whey are used in this study and characterized on the biochemical plan by dosage of the total proteins (Lowry method). The allergenicity of formulae is studied in Ussing chamber, by tests of provocation done on jejunal fragments of Balb/c mice, sensitized by parenteral way with β -lactoglobulin (β -Lg).

^{*} Auteur correspondant.

Adresse e-mail : soleil20042003@yahoo.fr (A.C. Brahim).

Results. – The obtained results show that the amount of proteins of both, standard and extensively hydrolyzed formulae is close to the amount found in human milk. On the plan of the allergenicity, the extensively hydrolyzed formula stimulates the current of short circuit (Isc). This reaction is comparable to the one gotten with the sensitizing protein (β -Lg), the native bovine whey, and the standard infantile milk. These results suggest the existence of a local anaphylactic reaction due to the direct interaction of the antigen making sensitive with the mucous membranes of jejunum fragments.

Conclusion. – The peptides of low molecular weights of the extensively hydrolyzed formula are endowed with an allergenic power to Balb/c mice.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Proteins hydrolyzed; Infant formulae; β -Lg; Milk formulae; Allergenicity of hydrolyzes; Human milk

1. Introduction

L'allergie aux protéines du lait de vache est une réaction exagérée du système immunitaire face à des protéines qu'il considère comme dangereuses. Ici, il s'agit des protéines du lait de vache que l'on peut retrouver dans le lait premier âge, mais aussi dans le lait maternel, lorsque la maman qui allaite consomme des laitages [1]. La prévention comme la recherche d'un traitement, constituent des sujets d'actualité. Ils reposent sur des hydrolysats de protéines, dont les indications respectives sont fondées sur leurs caractéristiques immunologiques et sur leurs risques allergiques [2]. L'allergie aux hydrolysats de protéines semble correspondre à une forme sévère d'allergie aux protéines du lait de vache [3] : elle n'est pas exceptionnelle puisqu'elle pourrait toucher 10 % des enfants allergiques au lait de vache. Actuellement, la potentialité d'un produit à prévenir l'allergie ne peut être déterminée, selon l'Espghan (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) et l'Espaci (European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology) que par des études cliniques randomisées ayant une méthodologie correcte. Notre objectif de travail est d'étudier les propriétés allergéniques d'une formule lactée extensivement hydrolysé par un test de provocation in vitro en comparant son allergénicité avec celle d'un lait standard et des protéines du lactosérum bovin natif à l'aide d'un model animal (souris Balb/c) rendu allergique aux protéines du lait de vache (β -Lg).

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits et réactifs

Les différents produits et réactifs utilisés proviennent de chez Sigma, Pharmingen, Merck et Prolabo (France).

2.2. Les échantillons utilisés dans cette étude

2.2.1. Pepti junior premier âge (Nutricia®)

Formé de concentré de protéines du lactosérum hydrolysées par des procédés technologiques (thermiques et enzymatiques). Il s'agit d'un aliment diététique destiné à des fins médicales spéciales pour les besoins nutritionnels en cas d'allergie aux protéines de lait de vache.

2.2.2. Aptamil alimentation normale premier âge (Nutricia®)

Il s'agit d'un lait industriel pour nourrisson ou préparation standard. Ce lait contient des protéines de lait de vache adaptées (protéines de lactosérum et caséine).

2.2.3. Le lait de vache

Cru (pH 6,8) collecté est écrémé par centrifugation à 3500 tours/min pendant 15 minutes à 4 °C, le lait est ensuite précipité à pH 4,6 par addition de HCl 1 N (pH isoélectrique des caséines), puis centrifugé à 3500 tours/min à 4 °C pendant 15 minutes. Le surnageant correspondant au lactosérum est récupéré. Le lactosérum est ensuite mis à dialyser pendant toute une nuit contre un tampon, à 4 °C, sous agitation continue. Le lactosérum est ensuite lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de type speed Vac concentrator 100 H.

2.3. Caractérisation biochimique

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Lowry [4], sur le lactosérum bovin natif, la préparation lactée standard et sur le lait extensivement hydrolysé. La lecture se fait au spectrophotomètre (Jasco-V530UV/VIS) à une longueur d'onde de 750 nm à l'aide d'une cuve en quartz. Les résultats sont comparés à une courbe standard préparée avec le sérum albumine bovine.

2.4. Animaux

Les animaux utilisés dans nos protocoles sont des souris de souche Balb/c obtenues auprès de l'institut pasteur d'Alger. Ce sont des souris femelles congéniques, élevées et acclimatées avant toute manipulation dans l'animalerie du laboratoire de physiologie de la nutrition et de sécurité alimentaire dans des conditions d'hébergement conformes à la réglementation. Les expériences sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, évitant le stress et l'agitation susceptibles d'interférer avec les résultats.

2.4.1. Immunisation du modèle animal

Femelles Balb/c sont utilisées pour le protocole d'immunisation. Les souris sont âgées entre six et huit semaines et pèsent entre 20 et 25 g ($22,50 \pm 0,27$ g). Pour les besoins de chaque expérience, les animaux ont été répartis en deux lots :

- premier lot : 48 souris femelles Balb/c immunisées avec la β -Lg native, cette dernière est la protéine allergisante majeure dans le lait de vache ;
- deuxième lot : 12 souris femelles Balb/c ne recevant aucun traitement. Ce lot constitue le groupe témoin.

Les souris du lot 1 sont immunisées par voie intra péritonéale. Chaque souris reçoit une dose de 100 μ L d'une solution de PBS pH 7,4 contenant 10 μ g de β -Lg mélangés à 2 mg d'Al (OH)₃. Les injections intra péritonéales ont lieu à J₀ puis, sous forme de rappels et dans les mêmes conditions, aux 14^e, 21^e et 28^e jours du protocole.

2.5. Mesure de l'allergénicité des différents échantillons

Afin d'évaluer l'allergénicité des protéines des différents échantillons, la technique *in vitro* en chambre de Ussing [5] est utilisée qui permet d'étudier l'interaction entre les différentes protéines des préparations infantiles avec l'épithélium intestinal des souris immunisées à la β -Lg. Cette technique permet d'analyser *in vitro*, les paramètres électriques caractérisant un tissu en mesurant le courant de court circuit I_{sc} (μ A/cm²) et la conductance G (mmho/cm²).

Un fragment de muqueuse intestinale est monté à plat entre deux demi-chambres de Lucite. Les deux faces du tissu déterminant un compartiment muqueux (représentant la lumière intestinale) et un compartiment séreux (représentant la circulation sanguine) sont baignés par des solutions identiques (composition chimique, température, pH, osmolarité et pression). Les deux faces du tissu sont maintenues à 37 °C et oxygénées continuellement par un courant de carbogène (O₂ : 95 %, CO₂ : 5 %) maintenant le pH à 7,4.

Dans ces conditions il n'existe aucun gradient électrique de part et d'autre du tissu.

On dépose 10 μ g/mL d'antigène (β -Lg), ou 20 μ g/mL poudre de lactosérum natif du lait de vache ou des préparations lactées, dans le compartiment séreux de la chambre. Les différents paramètres électrophysiologiques sont alors mesurés dans un premier temps, toutes les minutes durant les cinq premières minutes, puis un fois toutes les cinq minutes, durant 15 minutes d'expérience.

Pour vérifier les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de l'activité sécrétoire de l'épithélium intestinal lorsque ce dernier est activé par l'antigène sensibilisant, nous avons testé l'action d'un agent diurétique, le furosémide, qui est un inhibiteur spécifique du système de cotransport 2 Cl⁻/Na⁺/K⁺ situé sur la membrane basolatérale. Le furosémide entraîne une déplétion de la cellule en Cl⁻ et donc une diminution de la sécrétion de chlore.

Pour cela, nous avons monté des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β -Lg en chambre de Ussing et après stabilisation des paramètres électrophysiologiques de base, les tissus sont stimulés par du furosémide du côté séreux à la concentration de 10⁻⁵ M, puis le courant est mesuré toutes les minutes pendant cinq minutes. Les tissus ont été stimulés par la suite avec la protéine sensibilisante.

Pour vérifier l'intégrité structurale des fragments jéjunaux utilisés dans notre expérimentation, nous avons testé l'effet du glucose sur les versants muqueux et séreux de ces tissus à la fin des expériences. Le glucose a été déposé à la concentration de 10 mM.

2.6. Méthodes statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne plus ou moins erreur standard (X \pm ES). Les moyennes sont comparées à l'aide d'un test *t* de Student pour les données appariées et non appariées. L'analyse statistique est menée à l'aide d'un logiciel de statistique nommé STATISTICA (5.1.2006). L'analyse de la variance est effectuée avec le test Anova.

Le seuil de signification retenu est 5 %.

3. Résultat

3.1. Les résultats du dosage protéique

Les résultats du dosage protéique (*n* = 6) obtenus montrent que dans le lactosérum bovin natif, la teneur en protéines est de 6,86 \pm 1,28 g/L. La teneur en protéines totales de la formule standard est de 10,21 \pm 1,30 g/L, alors que celle de la formule extensivement hydrolysée est de 13,43 \pm 1,76 g/L.

3.2. Test de provocation *in vitro* en chambre Ussing

Des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg sont montés en chambre de Ussing et stimulés par le dépôt de la protéine sensibilisante β -Lg à la concentration de 10 μ g/mL dans le compartiment séreux. Une augmentation significative dans les valeurs de l'I_{sc} après dépôt de la β -Lg, qui passe des valeurs de bases de 47,60 \pm 5,24 μ A/cm² à 65,26 \pm 5,71 (Δ I_{sc} = 17,98 \pm 2,58 μ A/cm², *p* < 0,001). En revanche, l'I_{sc} des tissus des animaux témoins, ne varie pas après stimulation de ces derniers avec la protéine sensibilisante (β -Lg) (Fig. 1).

Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une réaction anaphylactique locale due à l'interaction directe de l'antigène sensibilisant avec le système immunitaire associé au tube digestif.

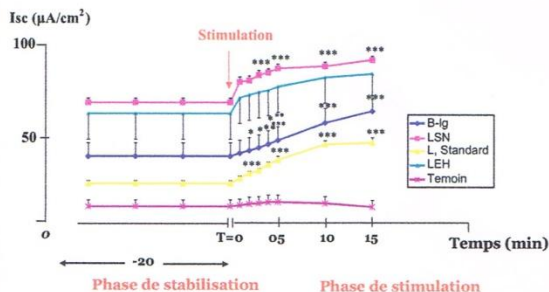


Fig. 1. Effet de la β -Lg, le lactosérum bovin natif, le lait standard et le lait extensivement hydrolysé sur le courant de court circuit (I_{sc}) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg (*n* = 10). Les valeurs exprimées sont des moyennes et leurs erreurs standards. * *p* < 0,05 ; ** *p* < 0,01 ; *** *p* < 0,001.

Le dépôt du lactosérum du lait de vache à la concentration de 20 µg/mL dans le compartiment séreux stimule l'augmentation de l'Isc des tissus des animaux sensibilisés à la β-Lg, les valeurs de bases passent de 68,73 ± 1,72 µA/cm² à 85,41 ± 1,52 (ΔIsc = 16,68 ± 0,70 *p* < 0,001). Ces résultats suggèrent l'existence d'une réaction anaphylactique locale due à l'interaction directe de l'antigène sensibilisant avec les muqueuses des fragments jéjunaux (Fig. 1).

Le dépôt de 20 µg/mL de chaque lait infantile dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés à la β-Lg provoque une augmentation très significative de l'Isc. Pour la préparation standard, les valeurs de bases passent de 37,02 ± 0,96 µA/cm² à 53,03 ± 1,93 (ΔIsc = 16,30 ± 1,48 *p* < 0,001), et de 64,37 ± 9,22 µA/cm² à 79,97 ± 9,28 (ΔIsc = 16,19 ± 2,99 *p* < 0,001) pour le lait extensivement hydrolysé (Fig. 1).

3.3. L'augmentation du courant de court circuit (ΔIsc)

Les valeurs de ΔIsc pour la protéine allergisante β-Lg, le lactosérum bovin natif, le lait standard et le lait extensivement hydrolysé sont représentées dans le Tableau 1.

3.4. Effet sur la conductance (G)

Nous avons mesuré les variations de la conductance (G) après stimulation des fragments jéjunaux des souris sensibilisées à la β-Lg avec la protéine sensibilisante et le lactosérum bovin natif et avec les deux laits infantiles (standard et extensivement hydrolysé). Les résultats indiquent une augmentation significative de la conductance (G) pour les tissus sensibilisés après dépôt de l'antigène sensibilisant β-Lg (*p* < 0,001). L'augmentation de la conductance est significative après dépôt du lactosérum du lait de vache sur les tissus sensibilisés à la β-Lg (*p* < 0,001).

Le dépôt des deux laits infantiles provoque aussi une augmentation de la conductance (G) sur les muqueuses des souris sensibilisées à la β-Lg, pour la préparation standards (*p* < 0,001) et pour le lait extensivement hydrolysé (*p* < 0,01) (Tableau 2). Cette augmentation de la conductance traduit probablement une altération de la barrière intestinale chez les

Tableau 1

Les valeurs de ΔIsc (courant de court circuit) des tissus sensibilisés à la β-Lg et stimulés avec la protéine sensibilisante β-Lg, lactosérum bovin natif, les préparations infantiles (standard et extensivement hydrolysé) ainsi que celles des témoins.

ΔIsc (µA/cm ²)	
<i>Souris témoins (n = 6)</i>	
ΔIsc β-Lg	2,03 ± 0,62
ΔIsc LSN	0,71 ± 0,59
ΔIsc Lait standard	3,30 ± 0,47
ΔIsc Lait extensivement hydrolysé	1,42 ± 1,15
<i>Souris immunisées à la β-Lg (n = 10)</i>	
ΔIsc β-Lg	17,98 ± 2,58
ΔIsc LSN	16,68 ± 0,70
ΔIsc Lait standard	16,30 ± 1,48
ΔIsc Lait extensivement hydrolysé	16,19 ± 2,99

ΔIsc = Isc (t₁₅) – Isc (t₀). T₀ : temps avant la stimulation du tissu ; T₁₅ : après 15 minutes de stimulation.

animaux sensibilisés. En revanche, pour les témoins aucune variation significative de ce paramètre n'a été enregistrée.

3.5. Effet du furosémide

Les résultats ont montré que lorsque le furosémide (Fig. 2) est ajouté dans le compartiment séreux, l'Isc ne varie pas et reste comparable avec les valeurs de base. Le dépôt de l'antigène sensibilisant dans le versant séreux ne produit aucune variation de l'Isc. Ces résultats impliquent que le courant de court circuit induit par l'antigène sensibilisant est bien un courant de chlore.

3.6. Effet du glucose

Les résultats (Fig. 2) montrent une augmentation très significative de l'Isc (*p* < 0,001). Cela indique que les tissus sont bien conservés et gardent leur intégrité structurale et fonctionnelle. Et que le furosémide n'a pas un effet toxique et qu'il n'interfère pas avec le mécanisme d'action de glucose. Donc les processus de cotransport glucose-Na⁺ ainsi que l'activité de la pompe Na⁺/K⁺ ATP ase ne sont pas altérés.

Tableau 2

Effet en chambre de Ussing de la protéine sensibilisante (β-Lg) et du lactosérum du lait de vache ainsi que les deux laits infantiles standard et extensivement hydrolysé sur la conductance (G) des fragments de jéjunum de souris sensibilisées à la β-Lg.

		G (mmho/cm ²)			
		B-Lg (n = 10)	LS bovin (n = 10)	Lait standard (n = 10)	Pepti junior (n = 10)
Témoin	T ₀	23,48 ± 3,95	18,69 ± 1,84	27,64 ± 0,81	22,88 ± 3,87
	T ₁₅	26,008 ± 4,38	21,31 ± 1,99	30,89 ± 1,27	26,79 ± 3,35
<i>p</i>		NS	NS	NS	NS
Sensibilisé à la β-Lg	T ₀	23,43 ± 2,21	20,85 ± 0,55	24,47 ± 1,25	25,38 ± 2,26
	T ₁₅	28,90 ± 2,35	27,01 ± 0,71	30,78 ± 1,17	31,61 ± 2,04
<i>p</i>		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,01

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standard recueillies au temps T₀ au moment de la stimulation des tissus par la protéine sensibilisante (β-Lg) et par le lactosérum du lait de vache ainsi que par le lait standard et le lait extensivement hydrolysé et après 15 minutes de la stimulation. NS : Non significatif ; n : nombre de tissus.

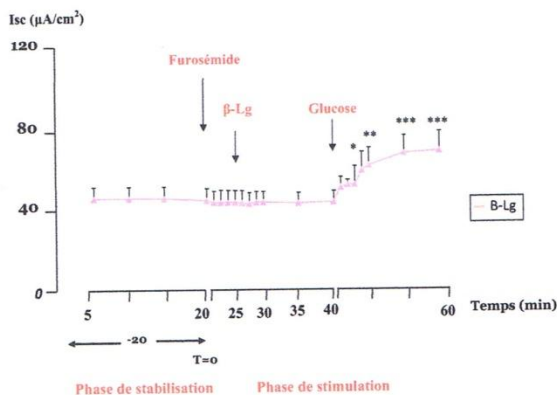


Fig. 2. Effet de la β -Lg sur le courant de court circuit (Isc) mesuré en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement incubé par le furosémide ($n=6$). Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4. Discussion

L'utilisation prolongée d'un lait HA ou d'un hydrolysât extensif de protéines est recommandée à condition qu'ils aient fait la preuve de leur efficacité par des études contrôlées. Le comité de nutrition de la société française de pédiatrie regrette que beaucoup de produits commercialisés hypoallergéniques n'aient fait l'objet d'aucune étude et que ces produits puissent être autorisés sur le marché avec cette allégation. C'est la raison pour laquelle ce travail a été entrepris, afin de contrôler la qualité d'un lait extensivement hydrolysé, en comparant son allergénicité avec celles d'un lait standard et des protéines du lactosérum bovin natif à l'aide d'un modèle animal (souris Balb/c) sensibilisé avec la β -lactoglobuline, la protéine allergisante majeure des protéines du lait de vache.

Après le dosage protéique des différents échantillons (lait standard, lait extensivement hydrolysé), les résultats obtenus concordent avec ceux mentionnés sur l'étiquetage, par l'industrie. La teneur en protéines des deux laits est proche de la concentration protéique du lait maternel comprise, entre 8 et 12 g/L, est nettement inférieure à celle des autres mammifères [6]. Néanmoins, cette concentration est parfaitement adaptée aux besoins du nourrisson en raison d'une excellente absorption et d'une parfaite adéquation du profil de ses acides aminés.

On a évalué le degré d'allergénicité des préparations lactées infantiles (standard et extensivement hydrolysé), afin d'approcher l'interaction in vitro, des protéines du lait standard et extensivement hydrolysé, ainsi que les protéines du lactosérum bovin natif avec la muqueuse intestinale des souris Balb/c sensibilisées par voie parentérale avec l'allergène majeur incriminé dans l'APLV (β -Lg). Cela en précisant sur le plan fondamental l'effet de ces protéines sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin, à savoir : la différence de potentiel (PD, mV), le courant de court circuit (Isc, $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) et la conductance du tissu (G, mmho, cm^2).

Dans nos résultats, il est clair que l'ajout de l'antigène (β -Lg) au versant séreux des jéjunums des souris immunisées à la

β -Lg, montés en chambre de Ussing, modifie les paramètres électrophysiologiques en augmentant significativement le courant de court circuit.

Nos résultats concordent, avec ceux rapportés par la littérature [7–9]. Ces études ont montré l'augmentation significative du courant de court circuit après la mise en contact de l'antigène sensibilisant avec les fragments intestinaux montés en chambre de Ussing. On peut traduire cette augmentation de l'Isc par le fait que le β -Lg agit sur les tissus des animaux sensibilisés en augmentant la sécrétion électrogénique de Na^+ et Cl^- , qui serait l'une des conséquences du passage des allergènes intacts ou presque à travers l'épithélium intestinal.

Nos résultats ont aussi révélé, une stimulation significative de la conductance chez nos souris immunisées. Cela reflète une atteinte de l'épithélium intestinal au niveau des jonctions serrées des souris sensibilisées. Les réactions d'hypersensibilités immédiates suivies par la sécrétion d'ions sont initiées par l'interaction des antigènes aux anticorps IgE à la surface des cellules mastocytaires de la muqueuse intestinale, en libérant des médiateurs (histamine, cytokines...) qui agissent sur des récepteurs se trouvant à la surface des cellules épithéliales [10,11]. Pour faciliter d'un côté, le passage des macromolécules au niveau des jonctions serrées [12] et augmenter la production des immunoglobulines spécifiques aux protéines du lait d'un autre. La β -Lg contribue de manière significative à l'allergénicité globale du lait de vache [13].

Le dépôt du lactosérum bovin natif et le lait standard sur les fragments de souris sensibilisées à la β -Lg stimulent le courant de court circuit, cela ce traduit par une fixation de l'antigène (β -Lg) sur les IgE fixés sur les mastocytes, lymphocytes, les plaquettes et la provocation d'une réaction anaphylactique locale au niveau des tissus des souris sensibilisées.

L'interaction du lait extensivement hydrolysé avec les muqueuses de souris sensibilisées montre que les peptides du lait extensivement hydrolysé stimulent le courant de court circuit (Isc). Nos résultats pourraient être expliqués par l'interaction entre les peptides de faibles poids moléculaires et les IgE sériques anti β -Lg. En effet ces peptides peuvent contenir dans leurs séquences des épitopes allergéniques. Selo et al. [14] ont montré que l'allergénicité de la β -Lg n'était pas directement liée à sa résistance à la digestion ni associée à l'intégrité de la molécule. Au contraire, la protéolyse de la β -Lg peut augmenter son allergénicité en révélant des épitopes masqués au sein de la structure tertiaire de la protéine. Alors, nos résultats montrent qu'aucune différence significative n'est enregistrée en ce qui concerne l'augmentation du courant de court circuit (Isc), entre la protéine sensibilisante (β -Lg), le lactosérum bovin natif, le lait standard et le lait extensivement hydrolysé. Donc le degré du pouvoir allergénique et la capacité de produire une réaction anaphylactique locale pour le lactosérum bovin, lait standard, lait extensivement hydrolysé sont pareils et aucune différence n'est enregistrée.

Nos résultats concordent avec ceux de [15] qui ont montré que l'analyse de quatre études comparant l'utilisation d'un hydrolysât extensif à celle d'un lait standard ne met en évidence aucune différence significative en ce qui concerne la survenue de manifestations allergiques, d'asthme, d'eczéma, de rhinite

allergique ou d'allergie alimentaire. Quatre autres études retenues, comparant l'utilisation prolongée d'un hydrolysat extensif à celle d'un hydrolysat partiel, a conclu également à l'absence de différence, sauf pour la survenue d'allergie alimentaire, au profit des hydrolysats extensifs.

Une étude multicentrique contrôlée, randomisée sur 2252 enfants ayant des antécédents atopiques familiaux (German infant nutritional intervention study GINI) a comparé l'effet préventif de différentes formules, dans cette étude la supériorité préventive d'un hydrolysat poussé de protéines (Nutramigen[®], hydrolysats de caséine) était observée, puisque l'ensemble des manifestations allergiques diminuaient quels que soient les antécédents dans la famille, mais une autre formule Pepti junior (Nutricia[®]), hydrolysats de protéines du lactosérum n'ayant aucun effet préventif.

Les résultats de l'étude GINI ont été confirmés avec une diminution, chez les enfants à risque de l'incidence de la dermatite atopique avec le Nutramigen[®] (hydrolysats de caséine) et le Nidal HA[®]. En revanche, aucune différence n'est observée avec le Pepti junior[®] [16]. Des cas d'allergie, ont été décrits avec des hydrolysats de protéines du lactosérum tels que Pepti junior[®] et Prégomine[®] [17,18], et les prick-tests sont clairement positifs. Une recherche [2], de sensibilisation croisée par prick-tests chez 37 enfants avec APLV montre une fréquence de sensibilisation croisée de 24 % pour Pepti junior[®], 9 % pour Pregestimil[®], 3,4 % pour Alfaré[®], et 2,8 % pour Prégomine[®].

5. Conclusion

Les peptides de faible poids moléculaire du lait extensivement hydrolysé étudié, semblent toujours conserver un potentiel allergisant significatif Chez les souris Balb/c.

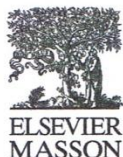
Donc l'allaitement maternel exclusif reste la meilleure recommandation pour prévenir l'apparition de manifestations allergiques chez un nourrisson allergique. Si l'enfant n'est pas allaité ou que la mère ne peut plus ou ne souhaite plus allaiter, le premier choix est une préparation à base d'hydrolysat extensif (eHF) de protéines du lait de vache (PLV), sous réserve que son efficacité ait été démontrée. En cas d'échec de l'eHF, une préparation d'acides aminés est justifiée. Les eHF de protéines de riz constituent une alternative aux eHF d'origine animale.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Dupont C. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *J Pediatr Puericul* 2008;21:156–7.
- [2] Moneret-Vautrin DA, Hatahet R, Kanny G. Hydrolysats de protéines : laits hypoallergéniques et formules extensivement hydrolysées. Bases immunoallergologiques de leur utilisation dans la prévention et le traitement de l'allergie au lait. *Arch Pediatr* 2001;8:1348–57.
- [3] Pétrus M, Lacrampe M, Villefranche C, Cossarizza G, Dutau G. Allergie aux protéines du lait et aux hydrolysats de protéines de lait : à propos d'une observation au diagnostic retardé. *Rev F Allergol Immunol Clin* 2006;46:416–8.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:193–251.
- [5] Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;25:110–27.
- [6] Turck D. Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Allaitement maternel : les bénéfices pour la santé de l'enfant et de sa mère. *Arch Pediatr* 2005;12:145–65.
- [7] Yang PC, Berin MC, Yu LCH, Conrad DH, Perdue MH. Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcεRII). *J Clin Invest* 2000;106:879–86.
- [8] Addou S, Tomé D, Kheroua O, Saidi D. Parenteral immunization to β-lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit. *Inter Immunophar* 2004;4:1559–63.
- [9] Saidi D, Heyman M, Kheroua O, Boudraa G, Bylsma P, Kerroucha R, et al. Jejunal response to beta-lactoglobulin in infants with cow's milk allergy. *CR Acad Sci III* 1995;318:683–90.
- [10] Rance F. Lymphocytes T et allergie alimentaire. *Rev F Allergol Immunol Clin* 2007;47:214–8.
- [11] Merja N, Sirpa J, Marja-Leena L, Hans S, Soili M-K, Johanna MK, et al. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β-Lactoglobulin allergen. *Structure* 2007;15:1413–21.
- [12] Perdue MH. Mucosal immunity and inflammation III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999;277:1–5.
- [13] Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in vitro digestibility of β-lactoglobulin. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008;9:62–9.
- [14] Selo I, Clement G, Bernard H, Chatel JM, Creminon C, Peltre G. Allergy to bovine β-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1055–63.
- [15] Osborn DA, Sinn J. Formula's containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;4:CD003664.
- [16] Von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pitroff B. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three year results of the German infant nutritional intervention study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:718–25.
- [17] Barau E, Dupont C. Allergy to cow's milk proteins in mother's milk or in hydrolyzed cow's milk infant formulas as assessed by intestinal permeability measurements. *Allergy* 1994;49:295–8.
- [18] Ammar F, De Boissieu D, Dupont C. Allergie aux hydrolysats de protéines. À propos de 30 cas. *Arch Pediatr* 1999;6:837–43.



Aliments

01

Évaluation du statut allergologique à distance d'un test de provocation oral pour une allergie aux protéines de lait de vache : à propos de 41 cas

M. Doan^a, M.V. Vodoff-Oehler^a, G. Newinger^b, F. Rancé^c, F. De Blay^d

^a Service de pédiatrie, Mulhouse, France

^b Service de pneumologie, Mulhouse, France

^c Unité de pneumologie et d'allergologie infantile, Toulouse, France

^d Unité d'allergologie, Strasbourg, France

Introduction.– La prise en charge de l'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) repose sur leur éviction suivie d'un test de provocation oral (TPO) en milieu hospitalier, à l'âge habituel de la guérison.

Matériel et méthode.– Nous avons étudié rétrospectivement les enfants ayant eu un au moins un TPO au lait de vache de 2001 à 2010 au centre hospitalier de Mulhouse. Puis nous avons évalué la consommation de protéines de lait de vache et les manifestations allergologiques à distance par un questionnaire téléphonique aux parents, au besoin complété par un questionnaire rempli par l'allergologue traitant.

Résultat.– On note que 41 enfants ont été étudiés. Le diagnostic d'APLV est posé à 3 mois pour 19 enfants (46,3 %). Les manifestations cliniques initiales sont cutanées dans 25 cas (61,1 %), digestives dans 9 cas (22,2 %), anaphylactiques dans 4 cas (11,1 %) et respiratoires dans 3 cas (5,6 %). Le premier TPO est négatif pour 30 enfants (73 %), à un âge médian de 24 mois. Parmi les 10 enfants ayant un deuxième TPO, 8 sont négatifs. Les familles ont été recontactées par téléphone (durée médiane de 2 ans après le premier TPO). Quinze enfants (40 %) ont un dégoût pour le lait, malgré un TPO négatif et 3 ne consomment aucun produit laitier. Quinze enfants sont suivis par un médecin allergologue. Quatre enfants (10 %) ont une allergie alimentaire symptomatique dont 2 une polyallergie, 6 (14,6 %) une polyallergie alimentaire et une allergie respiratoire et 3 (7,3 %) une allergie respiratoire.

Conclusion.– L'APLV, souvent de bon pronostic, peut être la première manifestation de la marche atopique. Quarante pour cent des enfants ayant un TPO négatif gardent un dégoût pour les protéines de lait de vache, avec un recul médian de 2 ans.

doi: 10.1016/j.reval.2012.02.007

02

Allergie au pignon de pin chez l'enfant

M. Moreigne^a, T. Bourrier^b

^a Service de pédiatrie, CH Antibes, Antibes, France

^b Hôpitaux pédiatriques, CHU Lenval, Nice, France

Introduction.– Le pignon de pin, fruit de différentes sortes de pins, est classé en allergie alimentaire parmi les fruits secs oléagineux. La première observation a été rapportée en 1958 par Santos Unger. La plupart des publications depuis, surtout à la fin des années 90, concerne des cas isolés ou de courte série, en particulier chez l'enfant (la plus grande série pédiatrique comporte trois patients).

1877-0320/\$ – see front matter

Matériel et méthode.– Nous rapportons dix observations d'enfants, de 18 mois à 17 ans, colligées sur une période de huit ans, présentant une allergie au pignon de pin, confirmée par pricks tests et IgE spécifiques. Cela représente à notre connaissance la série la plus importante chez l'enfant à ce jour.

Résultat.– Les dix enfants ont présenté les premières manifestations majoritairement entre l'âge de cinq et huit ans. La plus jeune a déclenché un angio-œdème à l'âge de 18 mois en suçant un pignon. On ne retrouve pas de prédominance d'un sexe. L'aliment déclenchant a été le pignon en natif dans sept cas et dans une préparation culinaire (pesto) dans deux cas. Les pricks tests allaient de 6 × 8 mm à 15 × 17 mm et les IgE spécifiques de 0,56 Ku/L à > 100 Ku/L.

Discussion.– La présentation clinique a la différence de la littérature n'est pas le plus souvent une anaphylaxie sévère et les symptômes sont modérés : urticaire, angio-œdème, douleurs abdominales ou syndrome oral. Le terrain atopique est quasiment systématique (huit cas sur dix). Nous ne retrouvons pas d'allergie croisée avec l'amande et deux enfants sont polysensibilisés aux fruits à coque. Un enfant qui présentait initialement un syndrome des allergies multiples mais ne gardait qu'une sensibilisation isolée au pignon de pin a réagi lors d'un TPO à la dose de 1 g (dose cumulée : 1,941 g). Les tests cutanés effectués en extrait Stallergènes[®] sont bien corrélés avec le dosage des IgE spécifiques.

Conclusion.– Le pignon de pin est sans doute à considérer comme un allergène émergent. Il faut distinguer cette hypersensibilité allergique IgE dépendante du Pine Mouth Syndrom de description récente et de mécanisme inconnu. Quelques heures après consommation de pignons d'origine asiatique (Corée) survient une agueusie avec goût amer et métallique durant huit à 15 jours et disparaissant sans séquelle.

doi: 10.1016/j.reval.2012.02.008

03

Prise en charge des enfants allergiques aux protéines de lait de vache par une formule infantile à base d'hydrolysats de riz

S. Addou, A. Merzouk, A. Brahim Chérifa, D. Saidi, O. Khérroua

Laboratoire de la nutrition et sécurité alimentaire, département de biologie, faculté des sciences, Iran

Introduction.– Les protéines du lait de vache peuvent entraîner chez certains nourrissons des effets indésirables comme l'allergie aux protéines du lait de vache. La substitution est réalisée par des préparations à base d'hydrolysats de protéines qui se caractérisent par une hydrolyse enzymatique des protéines dont la source est habituellement le lait de vache (caséine-lactosérum). Dans la prise en charge thérapeutique, on utilise des hydrolysats de protéines de lait. Dans la prise en charge thérapeutique de L'APLV, on utilise habituellement des hydrolysats de protéines de lait ou des laits de soja.

Matériel et méthode.– Nous avons procédé à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin de déterminer les différentes protéines qui composent cette formule infantile. D'autre part, notre expérimentation nous a permis de faire une



approche sur la caractérisation biochimique de cette formule infantile d'hydrolysate de riz en déterminant sa teneur en protéines par la méthode de Lowry. **Résultat.**— L'analyse des protéines de la formule infantile d'hydrolysate de riz par électrophorèse nous a permis, d'identifier des bandes protéiques, ce qui démontre l'absence de protéines intactes et que cette hydrolyse est partielle. La méthode de Lowry a montré que le lait infantile à base de riz hydrolysé contient moins de protéines, comparé aux autres laits d'origine animale, car sa teneur en protéines est proche de celle du lait maternel. Cette formule est parfaitement adaptée aux besoins nutritionnels du nourrisson. L'ajout de l'antigène (β -lg) β -lactoglobuline au versant séreux des jéjunums de souris immunisées à la β -lg, montés en chambre de Ussing, modifie les paramètres électrophysiologiques en augmentant Isc (courant de court circuit).

Discussion.— La formule à base de riz hydrolysé a été traitée par des méthodes technologiques afin de réduire le potentiel antigénique, ainsi que son allergénicité. **Conclusion.**— La formule à base de riz hydrolysé est adaptée pour couvrir les besoins nutritionnels du nourrisson en raison d'une excellente absorption. Cette formule infantile a été traitée par des méthodes technologiques afin de réduire le potentiel antigénique ainsi que son allergénicité.

doi: 10.1016/j.reval.2012.02.009

04

Identification d'une β -lactoglobuline comme allergène majeur d'un cas d'anaphylaxie au lait de bufflonne

J.P. Borges^a, F. Colin^a, C. Gironde^a, M. Rayssac^b, M. Petrus^b, P. Rougé^a, A. Barre^a

^a Faculté des sciences pharmaceutiques, Toulouse, France

^b Service de pédiatrie, Tarbes, France

Introduction.— Le lait de bufflonne utilisé dans la préparation de la mozzarella di bufala et de la ricotta, est un des laits les plus consommés au monde. Quelques cas d'allergie au lait de bufflonne ont été rapportés et en particulier un cas d'allergie à la mozzarella au lait de bufflonne a été diagnostiqué en 2011 chez un adolescent de 16 ans qui présentait également une allergie au lait de brebis et de chèvre mais non au lait de vache.

Matériel et méthode.— Nous avons montré, par Western-blot, que le sérum du patient interagit uniquement avec une fraction protéique du lait de bufflonne d'environ 12 kDa. Aucune réaction n'a été détectée avec les laits de jument, de brebis, de chèvre ou de vache. Une analyse par HPLC-ESI-MS-MS des peptides obtenus par hydrolyse trypsique de l'allergène nous a permis d'identifier sans ambiguïté l'allergène responsable : il s'agit de la β -lactoglobuline.

Résultat.— L'inhibition de l'interaction obtenue après incubation du sérum du patient en présence de concentrations croissantes de lait de bufflonne confirme bien le caractère spécifique de cette allergie. De plus, l'addition de concentrations croissantes de lait de vache n'abolit pas l'interaction et confirme bien l'absence d'une allergie au lait de vache associée.

Discussion.— C'est, à notre connaissance, la première fois que la β -lactoglobuline est identifiée comme un allergène du lait de bufflonne. Cependant, malgré une homologie de séquence élevée entre les β -lactoglobulines de bufflonne et de vache (98 %), le sérum du patient n'interagit pas avec le lait de vache.

Conclusion.— Les résultats obtenus expliquent que le patient puisse consommer sans aucun inconvénient du lait de vache ou de la mozzarella au lait de vache.

doi: 10.1016/j.reval.2012.02.010

05

Anaphylaxie alimentaire induite par l'effort. Rôle de la LTP de l'armoise

V. Doyen, C. Ledent, M. Mairesse, F. Corazza, O. Michel

Clinique d'immunoallergologie, CHU Brugmann, ULB, Bruxelles, Belgique

Introduction.— Il est classiquement rapporté que la sensibilisation aux protéines de transfert lipidique (LTP) est une cause d'anaphylaxie alimentaire pour les patients originaires du sud de l'Europe et que les allergies croisées pollens-aliments sont peu sévères. Ces deux notions doivent parfois être nuancées comme le démontre cette observation.

Matériel et méthode.— Une femme de 41 ans qui souffre d'une rhino-conjonctivite (RC) et d'un asthme pollinique depuis l'enfance consulte pour des

épisodes anaphylactiques répétés (10–15), parfois sévères depuis 1998. Les circonstances de survenue sont variables mais on retient comme point commun que les accidents surviennent après un repas comportant souvent du vin, au cours d'un effort (parfois très léger) et dans la moitié des cas à la fin de l'été.

Résultat.— Les PT sont positifs pour la dactyle (5/35 mm), le bouleau (5/30), le frêne (6/35), l'armoise (7/55), l'olivier (2/15), la carotte (3/30), le céleri (3/10), la noisette (3/25), le raisin rouge (3/15) et le vin rouge (4/30) (témoin histamine 5/40). Les IgE spécifiques sont positives pour : rPhl p1 et p5b 0,32 kU/L, nArtv1 2,67kU/L, nArt v3 39,6kU/L, Armoise 52,3kU/L, rBet vi 18,4kU/L, nOle e1 1,44kU/L, Sésame 0,71 kU/L, rPru p3 0,41 kU/L, céleri 3,88 kU/L et raisin 6,03 kU/L. L'Omega 5 gliadine est inférieur à 0,1 kU/L. La tryptase sérique de base est à 3 μ g/L.

Les TPO céleri, céleri et effort, sésame et raisin sont négatifs. Le TPO raisin et effort a été positif avec survenue d'une anaphylaxie grade II et augmentation de la tryptase à 7,8 μ g/L.

Après CAP déplétion, les IgE raisin sont inhibées complètement par la LTP de l'Armoise (nArt v3).

Discussion.— La LTP de raisin (allergène majeur) figure à la nomenclature officielle (Vit v1). Elle peut être responsable comme dans cette observation, d'anaphylaxies parfois sévères lors de la consommation de raisins frais, cuits, séchés mais aussi de vin voire de vinaigre. Par ailleurs, dans cette observation les accidents surviennent préférentiellement durant la période de pollinisation de l'armoise, ce qui soulève la question d'un éventuel rôle favorisant de l'exposition respiratoire.

Conclusion.— Anaphylaxie alimentaire à la LTP de raisin induite par l'effort due à une réaction croisée avec la LTP de l'armoise.

doi: 10.1016/j.reval.2012.02.011

06

Déclarations d'anaphylaxie alimentaire en Belgique. Données du réseau Allergovigilance

V. Doyen^a, C. Nootens^b, X. Van Der Brempt^c, S. Mulier^d, F. Pirson^e, S. Luyasu^f, J.P. Sacré^g, V. Pekus^h, E. Schneiderⁱ, N. Naeije^j, M. Fontaine^k, J.L. Grand^l, D. Moneret-Vautrin^l

^a Clinique d'immunoallergologie, CHU Brugmann, ULB, Bruxelles, Belgique

^b Hôpital Iris Sud, Bruxelles, Belgique

^c Service de pneumoallergologie, Waha

^d Service de pneumoallergologie, HUDERF, ULB, Bruxelles, Belgique

^e Service de pneumologie, cliniques universitaires St-Luc, UCL, Bruxelles, Belgique

^f Cliniques du Sud Luxembourg, Arlon

^g CHR Citadelle, Liège, Belgique

^h Service de pneumoallergologie pédiatrique, Bastogne

ⁱ Service de pneumologie, CHU Tivoli, La Louvière

^j Clinique d'immunoallergologie, CHU-Brugmann, Bruxelles, Belgique

^k Service de pneumoallergologie, Wavre

^l Réseau Allergovigilance, Vandoeuvre-Les-Nancy, France

Introduction.— Les données d'Allergovigilance concernant l'anaphylaxie alimentaire (AA) en Belgique manquent. Par défaut de structure nationale, les allergologues belges participent au recensement des anaphylaxies effectué par le réseau Allergovigilance (RAV) depuis 2001.

Matériel et méthode.— Les déclarations d'AA (2003–2011) du RAV en provenance de Belgique ont été analysées. Paramètres étudiés : âge (Enf : enfants < 12 a ; Ado : adolescents 12–18 a ; Adu : adultes > 18 a), sexe (F/H), allergène, type de réaction, usage d'adrénaline, cofacteurs (effort, alcool, stress, Aspirine, IEC, bêtabloquant), diagnostic (connu ou non) et antécédents (réaction allergique au même aliment non mise au point).

Résultat.— On note que 99 AA ont été déclarées :

— âge : quatre mois à 78 a ; 25 Enf, 12 Ado et 61 Adu ($n = 8 > 60$ a) ;

— rapport F/H : Enf 0,6/1 ; Ado 1/1 ; Adu 1,44/1 ;

— allergènes :

● enfants : arachide (40 %), fruits à coque (28 %), lait de vache (12 %), œuf (8 %), poisson (4 %), sésame (4 %) ;

● adolescents : arachide (33 %), crustacés (17 %), blé (8 %), lait de chèvre/brebis (8 %), épices (8 %), escargot (8 %), poisson (8 %), luzerne germée (8 %) ;

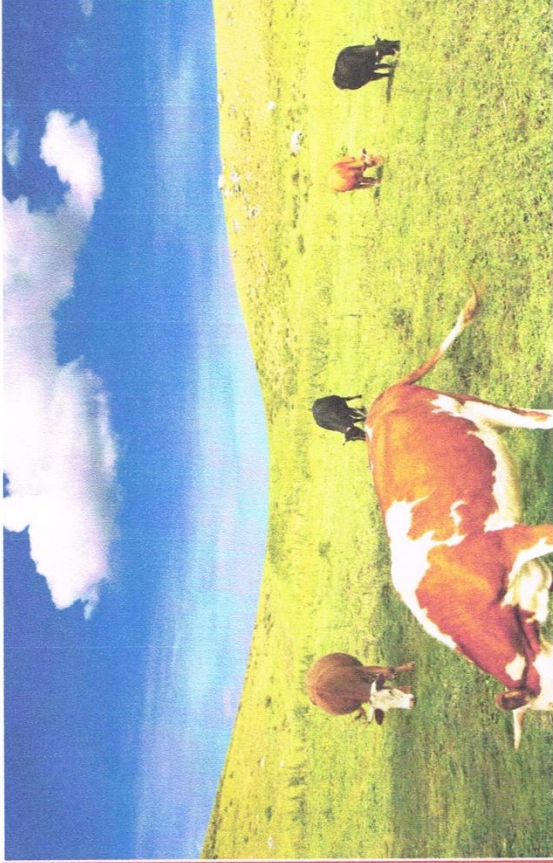
L'allergie aux protéines de lait de vache (APLV) touche 2 à 3 % des enfants dans la population générale. L'APLV comme toute allergie, il s'agit d'une réaction exagérée et inadaptée du système immunitaire face à des protéines qu'il considère comme dangereuses. Il s'agit des protéines du lait de vache que l'on peut retrouver dans le lait premier âge, mais aussi dans le lait maternel lorsque la maman qui allaite consomme des laitages. La prévention comme la recherche d'un traitement, constituent des sujets d'actualité. Ces dernières années une nouvelle préparation à base de protéines de riz hydrolysées a été commercialisée et pourrait constituer une alternative possible en cas d'APLV mais comme toutes les protéines végétales elles sont déficitaires en acides aminés essentiels et doivent être supplémenté pour assurer une meilleure croissance.

131



Samia Addou

Maitre de conférences à l'université, habilitée à la recherche. Docteur en nutrition humaine à (Agroparistech, Paris), diplômé de la faculté de pharmacie à (René Descartes, Paris V) en nutrition et diététique et en expérimentation animale.

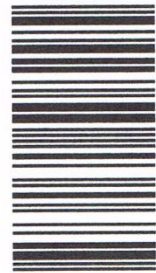


Allergie aux protéines du lait de vache

Addou, Brahim

Samia Addou
Amina Chérifa Brahim

Prise en Charge de l'allergie aux protéines du lait de vache



978-613-1-50829-5

**Samia Addou
Amina Chérifa Brahim**

**Prise en Charge de l'allergie aux
protéines du lait de vache**

Éditions universitaires européennes

Impressum / Mentions légales

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Information bibliographique publiée par la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek inscrit cette publication à la Deutsche Nationalbibliografie; des données bibliographiques détaillées sont disponibles sur internet à l'adresse <http://dnb.d-nb.de>.

Toutes marques et noms de produits mentionnés dans ce livre demeurent sous la protection des marques, des marques déposées et des brevets, et sont des marques ou des marques déposées de leurs détenteurs respectifs. L'utilisation des marques, noms de produits, noms communs, noms commerciaux, descriptions de produits, etc, même sans qu'ils soient mentionnés de façon particulière dans ce livre ne signifie en aucune façon que ces noms peuvent être utilisés sans restriction à l'égard de la législation pour la protection des marques et des marques déposées et pourraient donc être utilisés par quiconque.

Coverbild / Photo de couverture: www.ingimage.com

Verlag / Editeur:

Éditions universitaires européennes

ist ein Imprint der / est une marque déposée de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Allemagne

Email: info@editions-ue.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Impression: voir la dernière page

ISBN: 978-613-1-50829-5

Copyright / Droit d'auteur © 2014 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Tous droits réservés. Saarbrücken 2014



Allergie alimentaire

Les compétences en allergie alimentaire

Mollé Le Vaillant^{a,*}, M. Anton^a, N. Bocquel^b, C. Castelain^c, V. David^d,
 M. Debons^d, A. Juchet^e, F. Le Pabic^e, S. Morillon^f, D. Sabouraud^g, C. Rolland^h,
 A.-C. Vilainⁱ

^a Clinique médicale pédiatrique, CHU de Nantes, quai Moncoussu, 44093 Nantes cedex ; ^b pôle mère-enfant, CHBS, rue Louis-Guiguen, 56100 Lorient ; ^c clinique pédiatrique Saint-Antoine, hôpital Saint-Vincent-Paul, boulevard de Belfort, BP387, 59020 Lille cedex ; ^d service de dermatologie, CHU Hôtel-Dieu, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1 ; ^e hôpital des enfants malades, 330, avenue de Grande-Bretagne, TSA 70034, 31059 Toulouse cedex 9 ; ^f service de pédiatrie, CHU de Reims, 47, rue Cognac-Jay, 51100 Reims ; ^g association asthme et allergies, 3, rue de l'Amiral-Hamelin, 75116 Paris

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : isamolle@wanadoo.fr

Introduction.— L'enfant allergique alimentaire et sa famille sont confrontés au quotidien à de nombreuses situations à risque : école, loisirs, sorties scolaires, centres aérés, repas de famille, anniversaires. Ils doivent acquérir des compétences pour repérer l'allergène et éviter l'accident, et si celui-ci survient, le traiter tout en maintenant une qualité de vie optimale. Une prise en charge globale allant au-delà de la simple information s'impose et le temps d'une consultation n'est souvent pas suffisant. L'éducation thérapeutique (ETP) avec ses spécificités pédiatriques prend ici tout son sens.

Méthode.— Le Groupe de réflexion en éducation thérapeutique dans l'allergie alimentaire (GREATA) regroupe pédiatres, allergologues, dermatologues et diététiciennes. L'objectif est de mettre en commun leur expérience, de réfléchir sur leur pratique éducative et de proposer une démarche éducative commune en respectant les critères de qualité et les recommandations de l'HAS en matière d'ETP. Le GREATA a élaboré un référentiel des compétences en allergie alimentaire à partir de la matrice des compétences des maladies chroniques de R. Gagnayre et J.-F. d'Ivernois. Ce référentiel définit des compétences spécifiques à l'allergie alimentaire ; elles ont été élaborées pour les enfants par tranche d'âge et pour les parents d'enfants ayant une allergie alimentaire. Pour chaque compétence, des objectifs d'apprentissage ont été proposés. Des activités éducatives ludiques sont organisées pour atteindre ces objectifs.

Conclusion.— Le référentiel de compétences établi par le GREATA permet de mieux structurer l'éducation thérapeutique dans l'allergie alimentaire. Le GREATA continue à développer des documents : diagnostic éducatif, conducteurs, fiches d'évaluation qui pourront être mis à la disposition des nouvelles structures éducatives en allergie alimentaire.

26

Étude de l'antigénicité et de l'allergénicité de la formule lactée commerciale. Extensivement hydrolysée Pepti junior

A.C. Brahim, S. Addou, O. Khéroua
 D. Saïdi université, Oran

Mots clés : Pepti junior ; Hydrolysats de protéines ; Préparations infantiles -B-Ig -Formules lactées ; Allergénicité des hydrolysats ; Lait maternel

1877-0320/\$ – see front matter
 doi:10.1016/j.reval.2010.02.021

Introduction.— Les protéines du lait de vache peuvent entraîner chez certains nourrissons des effets indésirables comme l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). La substitution est réalisée par des préparations à base d'hydrolysats de protéines qui se caractérisent par une hydrolyse enzymatique poussée des protéines dont la source est habituellement le lait de vache (caséine-lactosérum).

Objectifs.— Étudier les caractéristiques biochimiques, l'antigénicité et l'allergénicité des protéines du lait extensivement hydrolysé (Pepti junior) et du lait infantile standard, à partir d'un modèle animal (souris Balb/c) sensibilisé avec la protéine allergisante majeure du lait de vache (B-Ig).

Matériel et méthodes.— Des souris femelles Balb/c (22,50 ± 0,27 g), 48 souris femelles Balb/c immunisées avec la β-Lg native et 12 souris femelles Balb/c ne recevant aucun traitement (groupe témoin). Des dosages des anticorps sériques ont été mesurés par la technique immunoenzymatique Elisa, l'allergénicité a été déterminée en chambre de Ussing, la teneur des protéines totales du lait standard, du lait extensivement hydrolysé (Pepti junior) a été étudié par la méthode de Lowry et par électrophorèse.

Résultats.— La teneur en protéines totales de la formule standard est de 10,21 ± 1,30 g/l, celle de la formule extensivement hydrolysée est de 13,43 ± 1,76 g/l. Le titre sérique en IgE anti-β-Lg est de 1/25^e. Cette présence des IgE dans les sérums des souris immunisées à la β-Lg traduit une réponse immunitaire IgE-dépendante. Les protéines du lait standard interagissent avec les IgG anti-β-Lg. Une faible réactivité est enregistrée entre les protéines extensivement hydrolysées (Pepti junior) et les IgG anti-β-Lg. Aucune différence significative n'est enregistrée pour ce qui concerne l'augmentation du courant de court circuit (Isc) provoquée par la protéine sensibilisante (B-Lg), le lactosérum bovin natif, le lait standard, le lait extensivement hydrolysé (Pepti junior).

Conclusion.— Les peptides de faible poids moléculaire du lait extensivement hydrolysés (Pepti junior) sont dotés d'un pouvoir allergénique. Le degré du pouvoir allergénique et la capacité de produire une réaction anaphylactique locale pour le lactosérum bovin, lait standard, lait extensivement hydrolysé. L'allaitement maternel exclusif reste la meilleure recommandation pour prévenir l'apparition de manifestations allergiques chez un nourrisson allergique.

27

Modifications du réseau protéique induites par le séchage des pâtes alimentaires : lien avec la digestibilité protéique et l'allergénicité in vitro des digestats

C. Brossard^d, M. Petitot^c, C. Barron^b, M.-A. Legoux^d, E. Paty^a, V. Micard^b, S. Denery^d

^a Pneumo-allergologie infantile, CHU Necker, Paris ; ^b UMR1208 IATE, SupAgro-INRA-UMI-CIRAD, Montpellier ; ^c UMR1208 IATE, SupAgro-INRA-UMI-CIRAD et Crecepal, Panzani, Montpellier et Marseille ; ^d UR 1268 BIA, INRA, Nantes

Le séchage des pâtes a évolué avec l'application de hautes températures pour des raisons technologiques et économiques ; leur application en fin de séchage permet d'améliorer les qualités culinaires des pâtes au blé (fermeté, pertes à la