

LISTE DES ABREVIATIONS

Al (OH)₃	Hydroxyde d'aluminium
APLV	Allergie aux protéines du lait de vache
APS	Persulfate d'ammonium
DAG	Diacylglycérol
DC	Cellules dendritiques
DDP	Différence de potentiel
DNP-KLH	Dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin
DO	Densité optique
EAG	Equivalent Acide Gallique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G	La conductance membranaire
GR	Gelée royale
IgE	Immunoglobuline E
IL	Interleukine
Ip	Intrapéritonéale
Isc	Le courant de court circuit
KDa	kilo dalton
Lf	Lactoferrine
LT	Lymphocytes T
MRJP	La protéine majeure de la gelée royale
N	Normalité
OPD	Orthophénylène diamine
OVA	Ovalbumine
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pH	Potentiel d'hydrogène
PLV	Protéines du lait de vache
PVA	Polyvinyl alcohol
SAB	Sérum albumine bovine

SDS	Sodium dodecylsulfate
Temed	Tetra Methyl Ethylene Diamine
TGF-β	Facteur de croissance Transformant beta (Transforming Growth Factor beta)
Th1	Lymphocyte T helper de type 1
Th2	Lymphocyte T helper de type 2
Treg	Cellule T régulatrice
Tris	Tris-hydroxyméthylaminométhane
α-Lac	Alpha-Lactalbumine
β-Lg	β -Lactoglobuline
μm	Micro mètre

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La prise en charge des antigènes alimentaires présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale	6
Figure 2. Voie d'activation du mastocytes via le FcεRI.....	13
Figure 3. Rôle des IgE lors des allergies IgE médiée.....	13
Figure 4. Résumé de la réaction allergique IgE dépendant	14
Figure 5. Larve de la reine baignant dans de la gelée royale	22
Figure 6. Composition moyenne de la gelée royale	27
Figure 7. Présentation de la zone d'étude.....	32
Figure 8. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	44
Figure 9. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I.....	52
Figure 10. Le dispositif de la chambre de Ussing	53
Figure 11. pH de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).....	62
Figure 12. Acidité de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).....	62
Figure 13. Teneur en eau, en matières sèches et en cendres brutes de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).....	63
Figure 14. Teneur en protéines de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès) mesurée par deux méthodes différentes (Lowry et Kjeldahl).....	64
Figure 15. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) des protéines brutes de la gelée royale dans les conditions dénaturantes -β-mercaptoéthanol et les conditions dénaturantes +β-mercaptoéthanol	66
Figure 16. Teneur en glucides de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).	67
Figure 17. Teneur en lipide de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).	67
Figure 18. Teneurs en polyphénols totaux de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).	69

Figure 19. La composition chimique de la gelée royale.....	70
Figure 20. Absorbance des anticorps sériques spécifiques de type IgE totale mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.....	71
Figure 21. Titres sériques des IgG anti β -Lg mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.	72
Figure 22. Absorbance des anticorps sériques spécifiques de type IgE anti β -Lg mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.....	74
Figure 23. Taux d'histamine plasmatique libérée suite au test de provocation chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.	75
Figure 24. Stades de manifestations cliniques observées chez les souris suite aux tests de provocation réalisés avec l'allergène (β -Lg) par voie intrapéritonéale.....	76
Figure 25. Test de la perméabilité vasculaire au bleu d'Evans chez des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.	78
Figure 26. Température corporelle des souris enregistrée après le test de provocation à la β -Lg.	79
Figure 27. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I chez des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.	80
Figure 28. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court-circuit (Isc) des fragments jéjunaux des souris sensibilisées à la β -Lg, mesuré en chambre de Ussing.....	82
Figure 29. Effet spécifique de la β -Lg sur la différence de courant de court circuit (Isc) (A) et son évolution au cours du temps (B) en réponse à la stimulation à la β -Lg ou à l'ovalbumine mesurée en chambre de Ussing	83

Figure 30. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court circuit, après dépôt du furosémide, sur des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β -Lg mesuré en chambre de Ussing.....	85
Figure 31. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court-circuit (Isc) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement traitées ou non à la gelée royale mesuré en chambre de Ussing.	86
Figure 32. Effet de la β -Lg sur l'évolution de la conductance (G) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg (T+) ou non (T-), mesurée en chambre de Ussing.	87
Figure 33. Effet de la β -Lg sur l'évolution de la conductance (G) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement traitées ou non à la gelée royale mesuré en chambre de Ussing.	89
Figure 34. Observation microscopique (G×100) d'un fragment de jéjunum d'une souris du groupe témoin négatif (coloration à l'hémalun-éosine).	92
Figure 35. Observation microscopique (G×100) d'un fragment de jéjunum d'une souris du groupe témoin positif ayant reçu per os une solution saline puis sensibilisées à la β -Lg (coloration à l'hémalun-éosine).....	92
Figure 36. Observation microscopique (G×100) des fragments de jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale aux doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration à l'hémalun-éosine).	94
Figure 37. Hauteur villositaire des fragments de jéjunums chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.	95
Figure 38. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris du groupe témoin négatif (coloration au bleu de toluidine).....	96
Figure 39. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris du groupe témoin positif (coloration au bleu de toluidine).	96
Figure 40. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 0,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).....	97

Figure 41. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 1g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).....	97
Figure 42. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 1,5 g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).....	97
Figure 43. Nombre des mastocytes au niveau du jéjunum des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. La position systématique d'abeille d'espèce <i>Apis mellifera intermissa</i>	20
Tableau 2. Propriétés organoleptiques	23
Tableau 3. Principales vitamines identifiées dans gelée royale	27
Tableau 4. Composition de gel de séparation et de gel de concentration	37
Tableau 5. Composition du tampon d'échantillon.....	37
Tableau 6. Composition du tampon de migration.....	39
Tableau 7. Composition de la solution de coloration.....	39
Tableau 8. Composition de la solution de décoloration.....	39
Tableau 9. Composition de la solution mère du tampon phosphate salin PBS 1M, pH 7,4	48
Tableau 10. Composition des solutions tampons utilisées dans la technique Elisa.....	48
Tableau 11. Classification admise pour mesurer les manifestations allergiques.....	50
Tableau 12. Composition de la solution de Ringer.....	55
Tableau 13. Composition du colorant à l'hématéine de Harris.....	60
Tableau 14. Composition des solutions tampons utilisées dans le comptage des mastocyte.	60
Tableau 15. Courant de court-circuit (a) et de la conductance (b) mesurés en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg prétraitées ou non avec de la gelée royale.....	90
Tableau 16. La différence de potentiel (DDP) mesurés en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg prétraitées ou non avec de la gelée royale..	91

Sommaire

Introduction	1
Rappels bibliographiques	
1. Histoire naturelle de l'allergie alimentaire	3
2. Epidémiologie de l'allergie alimentaire	4
3. La tolérance orale	4
3.1. Prise d'antigène, diffusion et présentation de l'antigène	5
3.2. Rôle des cellules dendritiques.	7
3.3. Rôle des cellules T Régulatrices (Treg)	8
3.4. Sensibilisation allergique: rupture de la tolérance orale	9
4. Physiopathologie d'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)	11
4.1. Les formes immunologiques impliquent dans l'allergie aux protéines de lait de vache.....	11
4.1.1. Les réactions de Type I (immédiate, à médiation IgE).	11
4.1.2. Les réactions de Type IV (retardée, à médiation cellulaire)	15
4.2. Les facteurs pouvant influencer l'expression des manifestations allergiques.....	15
4.2.1. Facteurs épigénétiques	16
4.2.2. Vitamine D	16
5. Traitement d'allergie alimentaire	16
5.1. Régime d'éviction.....	16
5.2. Les formules hypoallergéniques.....	17
5.3. Les traitements médicamenteux	17
5.4. Immunothérapie spécifique	17
5.5. Autre thérapie	18
6. L'apiculture en Algérie	19

7. La gelée royale	19
7.1. Origine.....	21
7.2. Compositions chimiques	21
7.2.1. Propriétés organoleptiques	23
7.2.2. Teneur en eau	23
7.2.3. Glucides.....	23
7.2.4. Protéines et acides aminés.....	24
7.2.5. Lipides	24
7.2.6. Acides totaux.....	24
7.2.7. Minéraux	25
7.2.8. Vitamines.....	25
7.2.9. La cendre	25
7.2.10. Pigments	25
7.2.11. Enzymes	25
7.2.12. Autres	25
8. Utilisation	26
9. Conservation de la gelée royale.....	26
10. La production mondiale de la gelée royale	28
11. Propriétés générales de la gelée royale.....	28
11.1. Activité antioxydante et anti-inflammatoire.....	28
11.2. Activité antitumorale.....	29
11.3. Effet immunomodulateur et antiallergique de la gelée royale	30
Matériels et Méthodes	
1. Produits chimiques, réactifs et matériel utilisés	31
2. La gelée royale	31
3. Etudes physico-chimiques de la gelée royale.....	31

3.1. Détermination du pH	31
3.2. Teneur en eau	31
3.3. Détermination de la teneur en matière minérale totale (ou cendres brutes)	33
3.4. Détermination de l'acidité	33
3.5. Dosage des protéines	34
3.5.1. Détermination de la teneur en azote total (Méthode de Kjeldahl)	34
3.5.2. Dosage des protéines totales selon la méthode de Lowry et al. 1951	35
3.6. L'extraction des protéines brutes de la gelée royale	36
3.6.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	36
3.7. Le dosage des glucides par la méthode de Bertrand	38
3.8. Teneur en matière grasse	40
3.9. Dosage des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu)	41
4. Etude des propriétés immunomodulatrices de la gelée royale.	42
4.1. Animaux et condition d'élevage	42
4.2. Adjuvant	42
4.3. Répartition des animaux	42
4.4. Protocole d'immunisation	43
4.5. Prélèvement sanguin	43
4.6. Dosage des anticorps IgE totaux	43
4.6.1. Principe général de la méthode ELISA sandwich	43
4.6.2. Mode opératoire	43
4.7. Dosage des anticorps IgG et IgE spécifique anti β-Lg	45
4.7.1. Principe général de la méthode ELISA indirecte	46
4.7.2. Mode opératoire	46
4.8. Détermination des taux d'histamine plasmatiques	47

4.9. Tests de provocation.....	49
4.9.1. Signes cliniques: test de provocation in vivo	49
4.9.2. La perméabilité vasculaire.....	49
4.9.3. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I.....	49
4.9.4. Mesure de la température corporelle	51
4.9.5. Expérimentation sur l'intestin isolé en Chambre de Ussing: test de provocation ex vivo	51
4.9.5.1. Principe de la chambre de Ussing	51
4.9.5.2. Montage de fragments de jéjunum de souris en chambre de Ussing	54
4.10. Etude histologique.....	56
4.10.1. Traitement des échantillons.....	56
4.10.1.1. Fixation.....	56
4.10.1.2. Déshydratation.....	56
4.10.1.3. Clarification.....	56
4.10.1.4. Inclusion	56
4.10.2. Traitement des lames.....	56
4.10.2.1. Etalement sur lames.....	57
4.10.2.2. Déparaffinage	57
4.10.2.3. Réhydratation	57
4.10.2.4. Coloration.....	57
4.11. Mesure de la hauteur des villosités.....	58
4.11.1. Principe.....	58
4.12. Comptage des mastocytes	58
4.12.1. Mode opératoire	58
4.12.2. Expression des résultats.....	59
4.13. Analyse statistique.....	59

Résultats

1. Etudes physico-chimiques de la gelée royale.....	61
1.1. Le pH.....	61
1.2. L'acidité libre	61
1.3. Teneur de l'eau.....	61
1.4. La cendre	61
1.5. Teneur totale en protéines dans la gelée royale.....	61
1.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	65
1.6. Teneur en glucides totaux.....	65
1.7. Teneur en lipides	65
1.8. Teneurs en polyphénols totaux de la gelée royale.....	68
2. Etude des propriétés immunomodulatrices de la gelée royale	68
2.1. Mesure des titres d'IgE totale, IgG et IgE spécifique anti β -Lg: Efficacité de la gelée royale....	68
2.1.1. Effet de la gelée royale sur le taux en IgE totale.....	68
2.1.2. Effet de la gelée royale sur le taux en IgG sérique anti β -Lg.....	68
2.1.3. Effet de la gelée royale sur le taux en IgE sérique anti β -Lg	73
2.3. Test de provocation in vitro: Evaluation des signes cliniques.	73
2.4. La perméabilité vasculaire.....	73
2.5. Température corporelle	77
2.6. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I.....	77
2.7. Etude ex vivo en chambre de Ussing: test de provocation locale	77
2.7.1. Mesure de la réaction anaphylactique locale (l'Isc).....	77
2.7.1.1. Effet de la sensibilisation à la β -Lg: Témoins positifs	81
2.7.1.2. Effet de l'ovalbumine sur l'Isc: spécificité de la réponse anaphylactique à la β -lg.....	81
2.7.1.3. Effet du furosémide	81
2.7.1.4. Effet du glucose.....	84

2.7.1.5. Effet de la β -lg sur l'Isc des fragments jéjunaux de souris traitées	84
2.7.2. Mesure de la conductance	84
2.7.2.1. Effet de la sensibilisation à la β -Lg: Témoin positif	84
2.7.2.2. Effet de la β -lg sur la conductance des fragments jéjunaux de souris traitées	88
2.7.3. Effet sur la DDP	88
2.8. Etude histologique	88
2.8.1. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs	93
2.8.2. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins positifs	93
2.8.3. Effet de la gelée royale sur la structure histologique de l'épithélium intestinal	93
2.8.4. Mesure la hauteur villositaire	93
2.8. Comptage des mastocytes	93
Discutions	99
Conclusion	112
Références bibliographiques	114

Introduction

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est un problème de santé publique avec de lourdes conséquences sur le développement de l'enfant. Elle débute le plus souvent chez le nourrisson âgé de moins d'un an (Rancé et Dutau, 2009; Denis et al., 2012). On distingue les formes à IgE-médiées, avec des manifestations de type réaginique (immédiat) et les formes non IgE-médiées, à médiation cellulaire, responsables de réactions retardées. L'incidence de l'APLV IgE-médiée est de 1,1% et est 4 fois plus élevée chez les enfants atopiques par rapport aux non atopiques (Ibsaine et al., 2013).

L'APLV est une réaction immunitaire contre une ou plusieurs protéines du lait de vache (toutes potentiellement allergisantes), avec des symptômes allant de légers symptômes gastro-intestinaux à un choc anaphylactique sévère (Rancé, 2004; Rancé et Dutau, 2009).

À ce jour, aucune thérapie efficace ciblant l'immunopathologie de l'allergie aux protéines du lait de vache n'est disponible et la pharmacothérapie est utilisée principalement pour soulager les symptômes d'hypersensibilité. La prise en charge diététique de l'APLV requiert l'élimination du régime de toute trace de protéines de lait (Dupont et Soulaines, 2017). Cependant, le régime d'éviction est souvent contraignant et difficile à respecter. Par conséquent, la recherche doit se concentrer sur le développement de mesures préventives et thérapeutiques efficaces pour gérer l'APLV.

Les thérapies médicales traditionnelles sont utilisées dans le monde entier pour la prévention et le traitement des maladies. L'apithérapie fait partie de la médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des produits apicoles. Les produits d'abeille les plus connus sont le miel, la propolis et la gelée royale. Ils sont largement utilisés pour renforcer le système immunitaire et prévenir les infections des voies respiratoires (Trumbeckaite et al., 2015).

La gelée royale est l'un des aliments naturels les plus riches en nutriments. Elle contient des protéines, des glucides, des lipides (Popescu, 2008a; Sabatini et al., 2009), mais aussi des acides aminés, des minéraux, des vitamines (surtout la vitamine B5), de nombreux oligo-éléments, enzymes et des facteurs antibiotiques.

Les investigations récentes ont mis en évidence le rôle crucial que joue la gelée royale dans le maintien et l'amélioration de la santé des humains grâce aux substances bioactives qui s'y trouvent.

En effet, il a été montré qu'elle possède diverses activités biologiques importantes telles que des activités anti-inflammatoire, antibactérienne, vasodilatatrice, antitumorale, anti-hypercholestérolémique, ainsi que des effets antioxydants et immunomodulateurs (Ramadan et Al-Ghamdi, 2012; Melliou et Chinou, 2014; Khazaei et al., 2018; Pasupuleti et al., 2017; Saeed et al., 2018).

Pour cela, elle est présente dans plusieurs préparations destinées au traitement des douleurs arthritiques, de l'hypertension artérielle, du diabète, de l'hépatite chronique, des troubles menstruels, de l'infertilité et de la fatigue. Toutes ces découvertes ont ouvert une nouvelle ère dans l'utilisation de la gelée royale.

Ce travail de thèse a donc pour but:

- Etudier la composition chimique de la gelée royale.
- Evaluer l'effet de la gelée sur la réponse immunitaire systémique développée chez des souris Balb/c rendues allergiques à la β -Lactoglobuline.
- Evaluer l'effet de la gelée royale sur la réponse anaphylactique locale chez les souris sensibilisées avec la β -Lg.
- Evaluer les effets de la gelée royale sur l'aspect histologique de l'intestin.

Rappels Bibliographiques

Rapport-Gratuit.com

1. Histoire naturelle de l'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire est un important problème de santé publique qui affecte les enfants comme les adultes et dont la prévalence tend à augmenter ces 20 à 30 dernières années, elle ne représente que 8 % des allergies en général mais elles sont de plus en plus fréquentes, les estimations de prévalence dans les pays développés avoisinant les 10 % (Dutau et Rancé, 2006; Savage et Johns, 2015). L'incidence est estimée à 4 % pour la population adulte et 8 % pour les enfants (Sicherer et Sampson, 2014).

Selon les individus et les aliments, ces allergies provoquent des réactions très variables et parfois mortelles (Sampson et al., 1992; Moneret-vautrin, 2008).

Les allergies alimentaires sont devenues un grand problème en raison de leur fréquence à tous les âges de la vie et de leur sévérité potentielle et de l'augmentation nette de l'anaphylaxie et du risque croissant de réactions aux allergènes masqués ou nouveaux caractérisant l'alimentation industrielle (Mullins, 2007; Taylor et Baumert, 2010). Chez les enfants, elles étaient presque toujours liées aux mêmes allergènes (lait de vache, œuf de poule, arachides, noix, soja et blé) (Sicherer et Sampson, 2014). Chez les adultes, s'additionne à cette liste les poissons et les crustacés (Iweala et al., 2018).

Chez le nourrisson, les protéines du lait de vache (PLV) sont les premiers et les seuls antigènes alimentaires introduits dans l'alimentation jusqu'à la diversification. C'est pourquoi l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est une pathologie qui survient de manière précoce essentiellement dans la première année de vie (Fiocchi et al., 2010). Les manifestations cliniques apparaissent précocement, le plus souvent avant l'âge de 6 mois.

L'évolution naturelle de l'APLV se fait le plus souvent vers la guérison. Cependant, cette allergie peut persister après l'âge de 3 ans (Rancé et al., 2005; Skripak et al., 2007). L'âge précoce du diagnostic, le type retardé des manifestations cliniques et l'absence d'asthme lors du diagnostic et/ou lors du suivi sont prédictifs de l'acquisition de la tolérance. Un suivi à long terme est nécessaire chez ces enfants, même après l'acquisition de la tolérance (Aissa et al., 2017).

Le diagnostic est basé sur les antécédents cliniques, les tests cutanés, les IgE spécifiques et parfois sur la provocation alimentaire (Bidat, 2006). Cependant, Il est parfois difficile de poser d'emblée un diagnostic correct et le risque de sous ou sur diagnostiquer une APLV est élevé.

Une démarche diagnostique rigoureuse s'avère nécessaire pour identifier les enfants présentant une APLV et les traiter avec une diète appropriée (Ezri et al., 2016).

2. Epidémiologie de l'allergie alimentaire

Depuis 35 ans, plusieurs estimations indiquent que la fréquence des allergies alimentaires est en augmentation dans la population générale (Rancé et Dutau, 2004).

En France, la fréquence des allergies alimentaires a doublé en cinq ans. L'allergie alimentaire est deux ou trois fois plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte (Dutau, 2003).

Selon Osborne et al. (2011), l'allergie alimentaire touche jusqu'à 10% des enfants et elle est actuellement en augmentation dans de nombreux pays avec une prévalence de 0,5 à 6% de la population infantile (Sampson, 1999; Koletzko et al., 2012; Nwaru et al., 2014) et 2% et 3% de la population générale (Sicherer et Sampson, 2014).

La prévalence des anaphylaxies graves (grades III et IV) est estimée entre 0,01 et 0,09 % chez les individus hospitalisés en urgence. Le risque annuel de décès par allergie alimentaire, estimé à 1/800 000, semble en augmentation (Macdougall et al., 2002). Les prévalences ont été étudiées pour certains aliments, en particulier chez les enfants de 2 à 5 ans : œuf (1,6-2,6 %), lait de vache (1,1-2,2 %), arachide (0,9-1,2 %) et noix d'arbres (0,5 %) (Rancé et Dutau, 2007).

En Algérie, une étude récente réalisée sur 770 enfants âgés de 0 à 3 ans dans la région du constantinois a fait apparaître une prévalence de l'APLV de 3,64 %, avec une prédominance masculine (Boughellout et al., 2015).

3. La tolérance orale

La tolérance orale est une réponse induite « par défaut » suite à une exposition à une protéine par voie gastro-intestinale. C'est une réponse immunitaire active, suppressive et spécifique, limitant toute réponse immunitaire effectrice qui serait induite suite à une nouvelle rencontre avec cette même protéine, qu'elle soit locale (intestinale) ou systémique (Pabst et Mowat, 2012). Cette suppression des réponses immunitaires se produit selon plusieurs mécanismes comprenant la production de cellules T régulatrices et la suppression de cellules T spécifiques d'antigène.

Dans les études sur l'histoire naturelle de l'allergie alimentaire, le développement de la tolérance est associé à une diminution des anticorps IgE spécifiques des aliments et à une augmentation des anticorps de type IgG4 ainsi qu'une augmentation des niveaux d'IL10 (Ruiter et al., 2007; Savilahti et al., 2010; Sommanus et al., 2014).

La tolérance orale requiert une maturation correcte du système immunitaire intestinal, qui débute dès la vie in utero puis néonatale, faisant intervenir des déterminants tels que l'alimentation et le microbiote intestinal. Enfin, des conditions environnementales, physiopathologiques ou d'exposition particulière pourront perturber les mécanismes d'induction de la tolérance orale (Adel, 2016).

3.1. Prise d'antigène, diffusion et présentation de l'antigène

Le système immunitaire de la muqueuse digestive, communément appelé le Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT), est exposé en permanence à de très nombreux antigènes étrangers provenant simultanément de l'alimentation et des micro-organismes de la flore commensale intestinale. Parallèlement à cela, l'intestin représente une des principales portes d'entrée des micro-organismes pathogènes dans l'organisme (Chinthrajah et al., 2016).

Les protéines et les peptides potentiellement immunogènes qui sont issus de la dénaturation et de la digestion intestinale peuvent traverser la barrière épithéliale via plusieurs mécanismes potentiels: la diffusion paracellulaire, transcytose à travers les cellules épithéliales intestinales, endocytose par les cellules Microfold (cellules M) et par échantillonnage direct par les macrophages (CX3CR1⁺) par un processus appelé «trogocytose» (Rescigno et al., 2001; Mabbott et al., 2013; Just et al., 2017) (figure 1).

Les cellules épithéliales intestinales peuvent également présenter directement les antigènes aux cellules T intra-épithéliales dans l'intestin, car elles peuvent exprimer dans certaines conditions le CMH II sur les surfaces basolatérales (Chehade et Mayer, 2005; Scott et al., 2011). Certaines cellules spécialisées sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigène à partir de l'intestin via des mécanismes distincts. Les cellules M sont un type de cellule épithéliale recouvrant le GALT (y compris les plaques de Peyer) qui ont un glycocalyx réduit. Elles s'engagent activement dans la phagocytose et la transcytose des particules d'antigène (y compris les microbes) et de manière moins efficace, des macromolécules solubles provenant de la lumière intestinale (Sicinski et al., 1990; Macpherson et Uhr, 2004; Chehade et Mayer, 2005).

Cependant, une autre voie d'entrée des antigènes de la lumière intestinale, indépendante des cellules M, a récemment été décrite. Cette voie implique une sous population des cellules myéloïdes CD11c⁺ présents dans le chorion, exprimant le récepteur CX3CR1. Ces cellules sont capables d'accéder à la lumière intestinale via des expansions cellulaires (dendrites) traversant la barrière intestinale et donc de capter directement les antigènes. Ce mécanisme nécessite

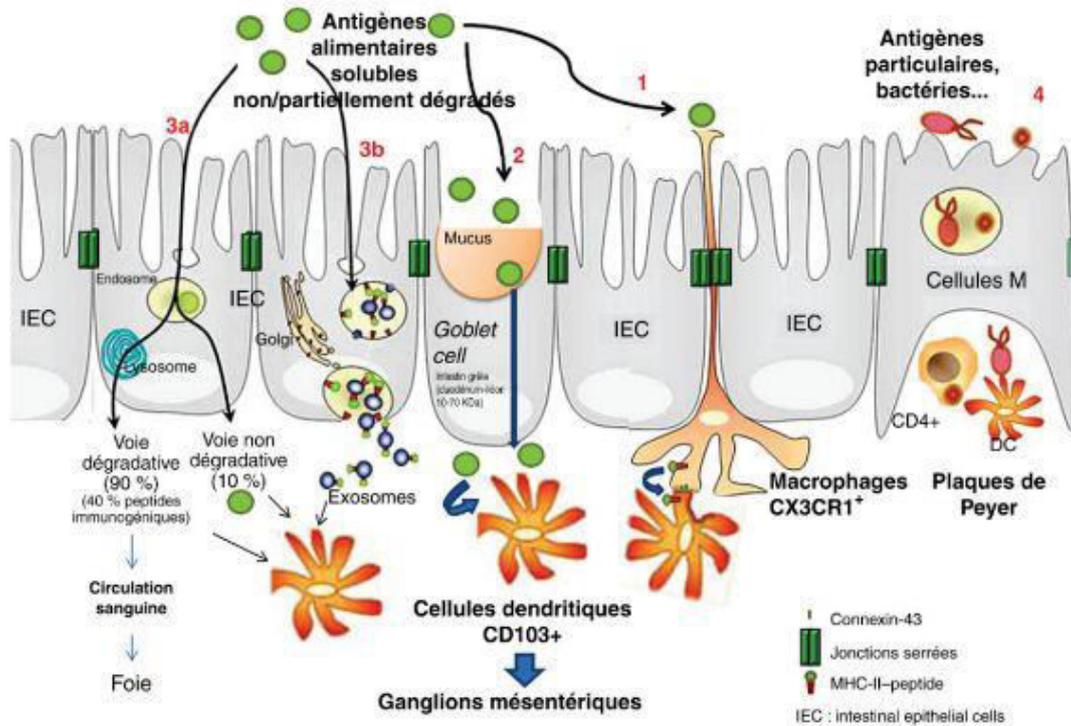


Figure 1. La prise en charge des antigènes alimentaires présents dans la lumière intestinale et leur présentation au système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (Just et al., 2017).

l'interaction de CX3CR1 avec son ligand CX3CL1/fractalkine, situé sur les cellules épithéliales. Ces cellules CD11c⁺ forment des jonctions serrées avec les entérocytes adjacents ce qui permet de conserver l'intégrité de l'épithélium intestinal (Rescigno et al., 2001; Niess et al., 2005).

Ces cellules ne migrent pas vers les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN) et ne peuvent pas activer les lymphocytes T naïfs, mais peuvent transmettre l'Ag aux cellules dendritiques migratoires (DC) voisines. Une fois l'antigène capté, ces dernières vont ensuite migrer dans les ganglions mésentériques (Schulz et al., 2009; Bain et Mowat, 2011; Pabst et al., 2012).

De plus, une autre étude a également mis en évidence une prise en charge des antigènes alimentaires luminaux par des cellules caliciformes et une délivrance préférentielle aux DC CD103⁺ (McDole et al., 2012). Cependant, l'interaction entre les cellules caliciformes et les CD103⁺ DC s'est avérée être un événement rare (Farache et al., 2013) et pourrait être pertinente en particulier à une concentration élevée de l'antigène.

Enfin, une autre voie a été mise en évidence dans les entérocytes, conduisant à un passage d'antigènes non dégradés (environ 2% des protéines) directement dans la circulation sanguine (Warshaw et al., 1974). L'absorption de protéines alimentaires entières est donc un processus physiologique normal. Leur transport via la veine porte et leur prise en charge par les cellules hépatiques telles que des cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer et/ou les cellules dendritiques, favorisait l'induction d'une tolérance plutôt que d'une réponse effectrice (Goubier et al., 2008; Thomson et Knolle, 2010; Pabst et al., 2012).

3.2. Rôle des cellules dendritiques

La tolérance orale résulte de la prise en charge guidée des protéines alimentaires par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) spécialisées et conditionnées par le microenvironnement intestinal particulièrement riche en cytokines régulatrices (TGF- β et IL10) et en acide rétinoïque (RA), un métabolite de la Vitamine A.

Parmi les CPA impliquées dans cette prise en charge; les cellules dendritiques (DC) exprimant la molécule CD103⁺ (Adel-Patient, 2016).

En effet, en condition homéostasique, après leur migration de la Lamina propria vers les ganglions lymphatiques mésentériques, les cellules dendritiques CD103⁺ CD11b⁺ présentent la capacité de produire de l'acide rétinoïque grâce à une enzyme, la rétinal déshydrogénase 2

(RALDH2), ainsi que du TGF- β et expriment l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane. L'ensemble de ces éléments permettrait la conversion des lymphocytes T naïfs en T régulateurs périphériques CD4⁺CD25⁺FoxP3 et leur *homing* dans la muqueuse intestinale. Ces lymphocytes seraient ensuite eux-mêmes impliqués dans l'inhibition des réponses Th2 et IgE spécifiques aux antigènes alimentaires et dans la promotion des réponses IgG4 (Wawrzyniak et al., 2017).

Par ailleurs, la tolérance orale repose sur la capacité des cellules dendritiques (DCs) à présenter les antigènes collectés dans la muqueuse intestinale aux lymphocytes T CD4⁺ naïfs: le type de réponse T induite dépendant alors en grande partie des cytokines et signaux dérivés des cellules dendritiques (Paidassi, 2017).

Une perturbation du fonctionnement des cellules dendritiques pourra ainsi rompre l'équilibre délicat immunité vs tolérance, générant l'apparition d'une réponse de type Th2 et d'une hypersensibilité aux allergènes alimentaires (Yu et al., 2016). De plus, l'inhibition de l'IDO diminue la conversion de Treg et favorise l'induction de Th1 et Th17 (Matteoli et al., 2010).

3.3. Rôle des cellules T Régulatrices (Treg)

Les Treg semblent actuellement essentiels dans la suppression de l'inflammation assurée par les lymphocytes Th2 et le maintien de la tolérance immunitaire. Les deux classes de lymphocytes CD4⁺ Treg les plus importantes sont les lymphocytes Treg naturels (nTreg) d'origine thymique et les lymphocytes Treg induits ou adaptatifs (iTreg) issus en périphérie de précurseurs T CD4⁺ conventionnels matures (DeLong et al., 2011; Oseroff et al., 2012).

La génération de Tregs fonctionnels spécifiques joue un rôle clé dans l'induction des réponses immunitaires appropriées aux allergènes (Palomares, 2013). La différenciation des iTreg en périphérie est dépendante de la cytokine régulatrice « transforming growth factor-beta » (TGF- β).

Les cellules T régulatrices expriment le facteur de transcription « forkhead box p3 » (foxp3), notamment sous l'effet de TGF- β actif produit par la DC CD103⁺.

Selon Paidassi et al. (2011), le TGF- β doit être activé par l'intégrine $\alpha\beta 8$ exprimée par les cellules dendritiques avant de pouvoir être reconnu par les cellules T et induire ainsi la génération des iTreg intestinale chez la souris.

Une étude très récente montre d'une part le rôle essentiel de l'expression de l'intégrine $\alpha\beta 8$

par les cellules dendritiques intestinales pour la génération de Treg intestinaux et le maintien de la tolérance orale et d'autre part qu'une dérégulation de l'expression de $\alpha\beta 8$ dans le tissu intestinal pourrait être à l'origine de la perturbation du compartiment de Treg et leur inefficacité à contrôler le développement de réactions inflammatoires aux antigènes de l'environnement (Paidassi, 2017).

Les cellules dendritiques CD103⁺ induisent l'expression des récepteurs homogènes de l'intestin CCR9 et $\alpha 4\beta 7$ sur les lymphocytes T sensibilisés dans les MLN (*mucosa-associated lymphoid tissue*) pour faciliter la migration des cellules T vers l'intestin grêle (Jaensson et al., 2008).

La déficience de l'intégrine CCR9 ou $\alpha 4\beta 7$ sur les lymphocytes T, ou une déficience du ligand de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (Madcam-1: *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) sur les cellules endothéliales de l'intestin inhibent la migration des cellules Treg vers l'intestin qui sont essentielles pour l'induction de la tolérance orale (Hadis et al., 2011; Cassani et al., 2011).

3.4. Sensibilisation allergique: rupture de la tolérance orale

Le maintien de la tolérance nécessite des interactions complexes entre les cellules non immunitaires et les cellules du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), qui contient 10^{12} cellules lymphoïdes par mètre de tube digestif et plus de cellules productrices d'immunoglobulines que dans le reste du corps (Mestecky et McGhee, 1987; Van der Heijden et al., 1987; Brandtzaeg et al., 1998). Ces cellules doivent agir de concert pour limiter les réponses inflammatoires aux bactéries et aux protéines alimentaires qui pourraient causer des lésions tissulaires, garder les microbes confinés dans l'intestin et reconnaître les agents pathogènes susceptibles de causer des lésions ou des maladies. L'incapacité à atteindre un équilibre approprié dans ces rôles peut conduire à une perte de tolérance entraînant des maladies inflammatoires telles que des maladies intestinales inflammatoires ou des réponses à des aliments inoffensifs comme la maladie cœliaque et les allergies alimentaires à IgE.

Les événements incitatifs menant à la rupture de la tolérance orale, à la sensibilisation allergique et au développement d'allergies alimentaires chez les personnes sensibilisées sont mal compris. Il est probable que de multiples voies pourraient finalement conduire à un échec quant au développement ou la perte de la tolérance orale.

Une étude récente a abordé les mécanismes immunitaires impliqués dans la tolérance orale et la manière dont l'altération de ces derniers pourrait favoriser la rupture de la tolérance orale et le

développement d'allergies alimentaires (Chinthrajah et al., 2016). Parmi les facteurs pouvant affecter ces réponses immunes le microbiote commensal qui joue un rôle dans le maintien de la tolérance orale. Ce rôle a été révélé grâce à l'étude de l'association entre la dysbiose intestinale et l'allergie alimentaire ainsi que le rôle des métabolites bactériens dans la régulation de l'intégrité épithéliale et des réponses immunitaires intestinales (Stefka et al., 2014; Blázquez et Berin, 2017).

Au niveau du tube digestif, la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote produit des acides gras à courtes chaînes tels que l'acétate, l'acide propionique et plus particulièrement l'acide butyrique qui peuvent avoir de multiples effets sur la réponse immunitaire (Vital et al., 2014; Berni Canani et al., 2015). Par exemple, ils permettent notamment l'induction de cellules T régulatrices au niveau du côlon (Furosawa et al., 2013).

Le butyrate stimule la prolifération des cellules épithéliales, régule l'inflammation et exerce un rôle anti-carcinogène (Hamer et al., 2008). Les effets du butyrate passent par sa capacité à moduler l'expression génique en agissant sur l'acétylation des histones et de l'ADN pour favoriser la transcription (Daly et Shirazi-Beechey, 2006). De plus, les acides gras à courtes chaînes issus du métabolisme bactériens jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose indispensable au renouvellement de l'épithélium intestinal (Hague et al., 1993).

En outre, la sensibilisation cutanée aux antigènes alimentaires présenterait un mécanisme possible, qui pourrait conduire à l'incapacité de développer une tolérance orale ou à sa perte (Chinthrajah et al., 2016).

Une étude récente a mis en évidence l'impact à la fois de l'épithélium cutané altéré et/ou enflammé, et de la présence d'antigène alimentaire dans les poussières domestiques, dans l'induction d'une sensibilisation aux allergènes alimentaires (Noti et al., 2014).

Une altération néonatale de la barrière cutanée, suite à une augmentation de la perméabilité cutanée, même en l'absence de dermatite atopique, est prédictive du développement d'une allergie alimentaire avant l'âge de deux ans (Kelleher et al., 2016). Le rôle de la flore cutanée sur la maturation du système immunitaire associé à la peau et/ou dans ces sensibilisations reste à élucider.

La tolérance orale aux protéines alimentaires est le résultat d'interactions complexes entre les antigènes alimentaires, le microbiote intestinal, les cellules non immunes de l'intestin, et les

cellules présentatrices d'antigènes (CPA) spécialisées ainsi que les lymphocytes associés à l'intestin (Chinthrajah et al., 2016).

4. Physiopathologie d'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)

L'allergie aux protéines du lait de vache est définie par la survenue de manifestations cliniques dues à une réponse immunologique anormale après ingestion des protéines lactées bovines (Dupont et al., 2010).

Parmi les protéines responsables de l'APLV, les trois allergènes principaux sont l' α lactalbumine, la β -lactoglobuline et la caséine (Wal, 1998; Natale et al., 2004; Tsabouri et al., 2014) ainsi que d'autres protéines telles que la sérum albumine bovine (SAB) et la lactoferrine (présents sous forme de traces) qui sont aussi des allergènes potentiels (Sharma et al., 2001; Fritsche, 2003; Negaoui et al., 2016). La différence de composition existant entre les protéines du lait de vache et celles du lait humain peut être l'une des raisons de l'induction de l'allergie au lait de vache chez les nourrissons (Fox et McSwenney, 1998). En outre, la teneur en immunoglobuline est plus élevée dans le lait maternel que dans le lait de vache, ce qui peut améliorer les fonctions immunitaires des nourrissons et les prévenir contre l'allergie (Fox et McSwenney, 1998; Guo, 2001; El Agamy, 2007).

4.1. Les formes immunologiques impliquées dans l'allergie aux protéines de lait de vache

L'allergie aux protéines de lait de vache est l'une des premières allergies à se manifester chez le nourrisson dès l'introduction des premiers biberons. Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité immédiate (Wal, 2011) pouvant impliquer des mécanismes IgE-médiée (les symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion de l'allergène) ou non IgE-médiée ou retardée (les symptômes vont se manifester plusieurs heures après la prise de l'allergène ou encore mixtes IgE/non IgE-médiés (Fiocchi et al., 2010; Katz et al., 2010; Pramil et Rancé, 2011; Koletzko et al., 2012; Kim et Burks, 2015).

4.1.1. Les réactions de Type I (immédiate, à médiation IgE)

Les réactions d'hypersensibilité médiées par l'IgE aux protéines du lait de vache ou (type 1) sont caractérisées par une réponse T helper 2 (Th2).

La réaction allergique se déroule en deux phases distinctes, séparées dans le temps. Suite au premier contact avec l'allergène, des cellules T spécifiques sont induites, sécrétant de l'IL4 et de l'IL13. Ces cytokines vont induire la transformation des lymphocytes B naïfs spécifiques de l'antigène en plasmocytes producteurs d'IgE spécifiques. Les IgE spécifiques circulent dans

l'organisme et se fixent sur leurs récepteurs de haute affinité (FcεRI), exprimés par les basophiles circulants et les mastocytes muqueux. Cette phase, dite de sensibilisation, est cliniquement muette: le patient est sensibilisé mais ne montre pas de symptômes.

Lors de contacts ultérieurs avec le même allergène (ou un allergène de structure proche dans le cas d'allergies croisées), il est reconnu par les IgE spécifiques liées à ces cellules effectrices. Cette reconnaissance peut alors induire l'agrégation des FcεRI et l'activation de multiples cascades de signalisation intracellulaire impliquant des protéines tyrosine kinase de la famille Src, Syk et Lyn. Le FcεRI est un complexe moléculaire constitué de quatre sous unités; une chaîne α qui se lie aux IgE, une chaîne β et un dimère de chaîne γ. La signalisation intracellulaire s'effectue par l'intermédiaire des chaînes β et γ; leur portion intracytoplasmique comporte des résidus de leucine et de tyrosine représentant un motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine, associé à Lyn. Ces enzymes permettent la phosphorylation secondaire de la phospholipaseγ1 (PLCγ1) grâce au recrutement de Syk. L'activation de la PLCγ1 est à l'origine de l'apparition de messagers constitués du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). La molécule DAG permet l'activation de la phosphokinase C (PKC). Parallèlement, l'IP3 se fixe sur la membrane du réticulum endoplasmique entraînant la libération du stock de Ca⁺⁺ dans le cytoplasme de la cellule (mastocyte ou basophile) puis l'ouverture des canaux calciques qui conduit finalement à la dégranulation des mastocytes, la libération rapide du contenu de granules intra-cellulaires (histamine, tryptase) et à la synthèse et à la sécrétion de médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes) responsables de symptômes précoces (Blank et David, 1998; Tkaczyk et al., 2004; Nosbaum et al., 2014) (figure 2 et 3).

Cette seconde phase correspond à une réponse inflammatoire locale déclenchée par les médiateurs libérés par les mastocytes et les basophiles. Certains de ces médiateurs possèdent une activité chimiotactique qui favorisent le recrutement d'éosinophiles, de neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes au site de l'inflammation. Les cellules recrutées libèrent alors des protéases qui provoquent des lésions tissulaires (Ballmer-Weber et al., 2015; Turner et al., 2016).

Les caractéristiques cliniques de allergie au lait de vache en raison des réactions médiées par les IgE sont exprimées comme des symptômes immédiats impliquent particulièrement la peau, les voies respiratoires et/ ou le tractus gastro-intestinal et la circulation systémique ou même des réactions généralisées (irritabilité, troubles du sommeil, une mauvaise croissance) (figure 4). Ceux-ci peuvent même conduire à des réactions anaphylactiques systémiques graves qui

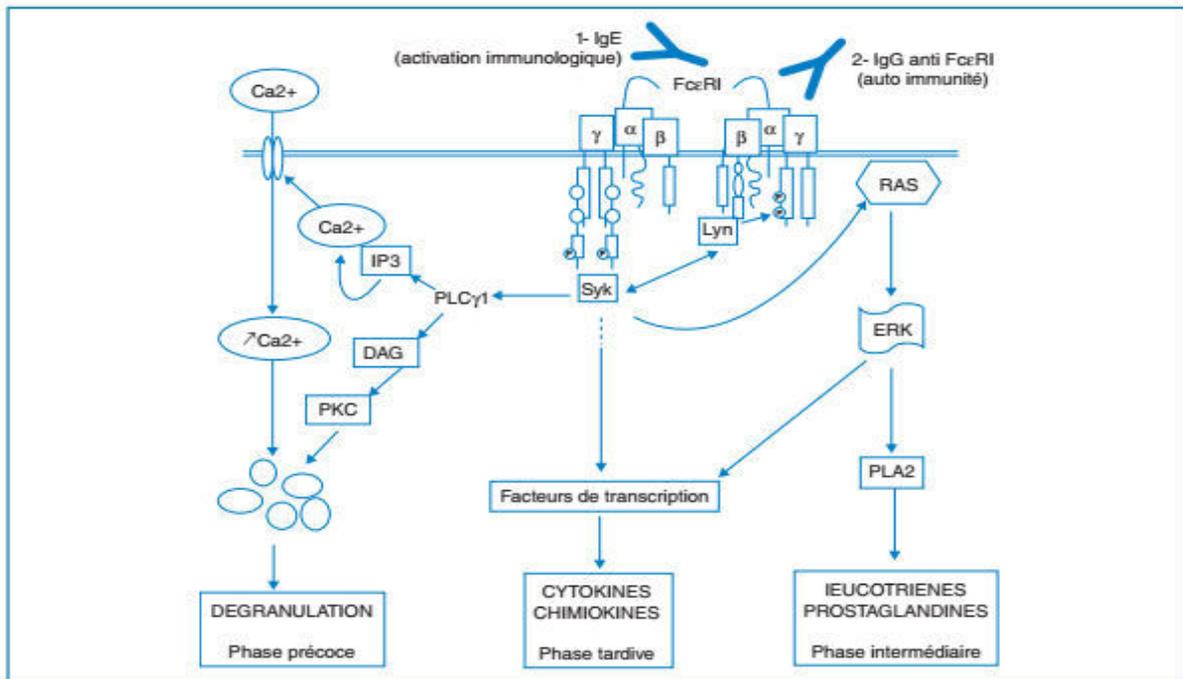


Figure 2. Voie d'activation du mastocytes via le FcεRI (Hennino et al., 2006).

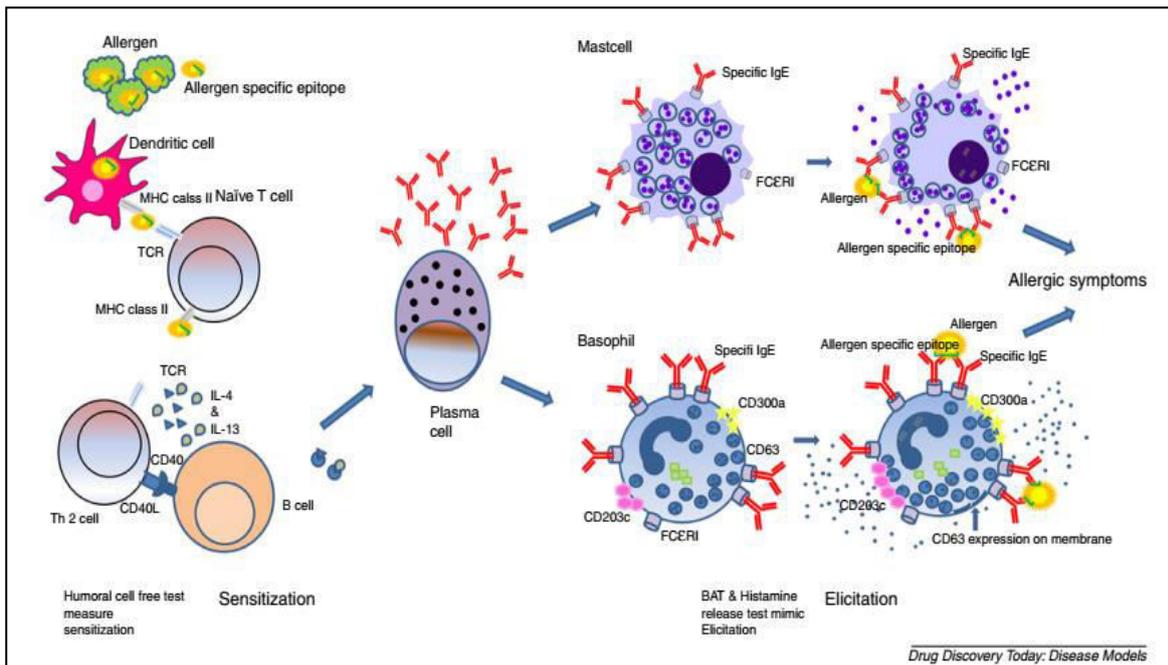


Figure 3. Rôle des IgE lors des allergies IgE médiée (Broekman et al., 2015).

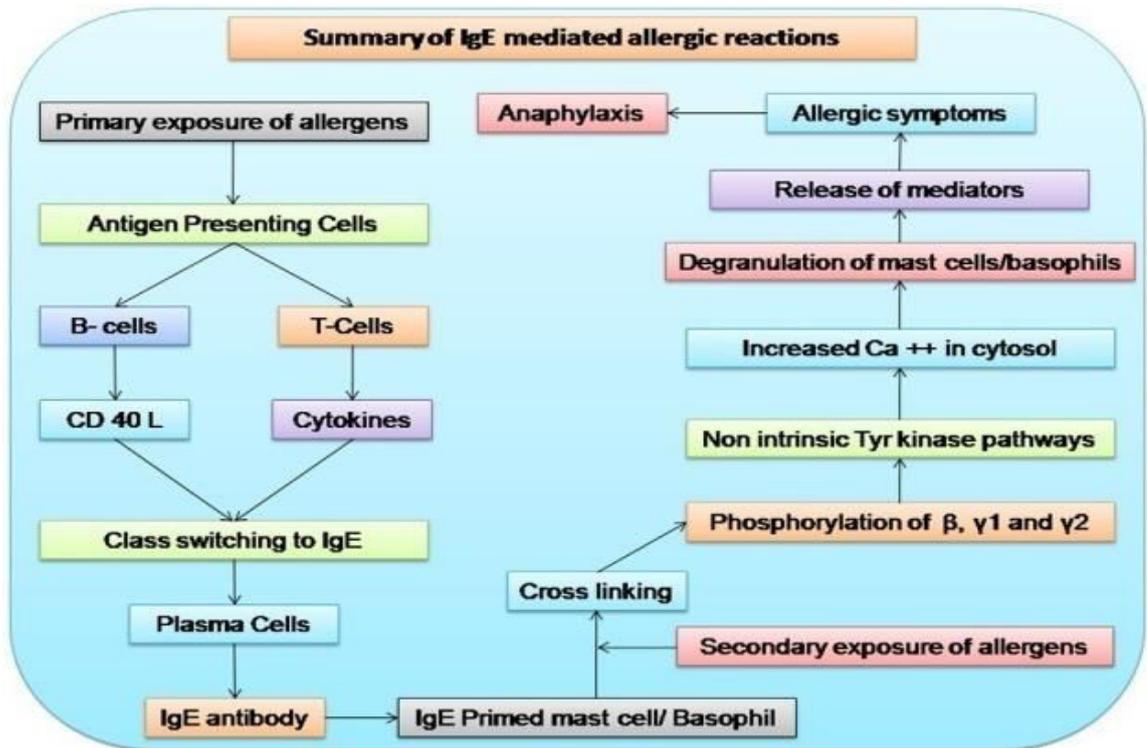


Figure 4. Résumé de la réaction allergique IgE dépendant selon Kumar et al. (2012).

constituent une urgence médicale (Perez-Machado et al., 2003; Levy et al., 2012; Salvatore et Vandenplas, 2016).

4.1.2. Les réactions de Type IV (retardée, à médiation cellulaire)

Elles impliquent des lymphocytes T spécifiques qui en présence de l'allergène entraînent la production de cytokines inflammatoires (LT CD4+) ou activent la cytotoxicité (LT CD8+).

Les symptômes se développent généralement une à plusieurs heures ou plusieurs jours après l'ingestion de lait de vache. Il n'y a pas de tests fiables de laboratoire pour diagnostiquer les réactions retardées, non IgE-médiées. La majorité des signes sont gastro-intestinaux, mais d'autres manifestations touchant la peau et les voies respiratoires peuvent se produire (Tsuge et al., 2006; Fiocchi et al., 2010; Vrdoljak et al., 2014).

L'hypersensibilité du type IV est probablement le mécanisme responsable de la maladie cœliaque et des formes entéropatiques d'intolérance aux protéines du lait de vache (Andre, 1992).

4.2. Les facteurs pouvant influencer l'expression des manifestations allergiques

Chez le nouveau-né, l'immaturation de la fonction intestinale ainsi que le déficit transitoire en IgA étaient des facteurs physiopathologiques prédisposant à l'APLV. Ils ne sont pas les seuls, le terrain atopique familial est un des éléments les plus prédictifs de l'APLV (Saarinen et al., 1999; Moneret-Vautrin et al., 2001).

La physiopathologie des maladies atopiques, dont l'allergie alimentaire, met en jeu des facteurs génétiques et environnementaux (Desjeux et al., 1994; Garnier et al., 2017) tel que le tabagisme maternel (Kulig et al., 1999; Lannero et al., 2008; Keil et al., 2009; Thacher et al., 2016). Une sensibilisation allergénique in utero rend compte des réactions allergiques au premier contact avec l'allergène (Feiterna-Sperling et al., 1997; Nemni et al., 2006). Une sensibilisation par le lait maternel (Kilshaw et Cant, 1984; Isolauri et al., 1998; Denis et al., 2012), l'absence d'allaitement maternel ou d'une durée trop courte (moins de 4 mois) (Ashley et al., 2015) et des altérations précoces de la composition du microbiote intestinal (hygiène, accouchement par césarienne programmée, prise d'antibiotiques) peuvent donc induire une dysbiose (moindre diversité microbienne, altération de la composition en certaines communautés bactériennes) dans les premiers mois de vie qui pourrait avoir des effets à long terme sur le développement des

allergies (Dominguez-Bello et al., 2010). On estime d'autres facteurs de risque, comme les facteurs épigénétiques et la vitamine D.

4.2.1. Facteurs épigénétiques

L'épigénétique est récemment apparue comme un mécanisme potentiel dans le développement de l'allergie alimentaire. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation de l'incidence des maladies allergiques via la modification par l'environnement et de l'expression des gènes clés dans le développement de l'allergie (Martino et al., 2014).

4.2.2. Vitamine D

Il semblerait également que des carences ou excès en vitamine D pourraient avoir un rôle dans l'apparition d'allergie alimentaire. En effet, certaines études affirment qu'un excès de vitamine D conduirait au développement des allergies (Weisse et al., 2013), d'autres études affirmeraient le contraire (Baek et al., 2014).

5. Traitement d'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire médiée par IgE est le résultat de différents mécanismes immunologiques et est donc susceptible d'exiger différentes approches immunothérapeutiques pour apporter une solution à ce problème. Les avantages potentiels de cette thérapie sont l'accélération du développement de la tolérance et l'amélioration de la qualité de vie chez les patients (Nowak-Węgrzyn et al., 2011).

5.1. Régime d'éviction

Les traitements de l'allergie alimentaire sont principalement préventifs et symptomatiques. Le régime d'éviction de l'allergène est la première étape de la prise en charge de l'allergie alimentaire. Ce traitement consiste à éliminer les aliments incriminés afin de prévenir les réactions anaphylactiques et de guérir les symptômes chroniques associés.

Néanmoins, cette stratégie thérapeutique altère notablement la qualité de vie du patient et de sa famille par la difficulté croissante de sa réalisation. L'éviction stricte n'empêche pas le développement de la sensibilisation avec l'âge et est incriminée dans l'augmentation de la réactivité clinique. Ceci se traduit par une sévérité accrue ou bien par un seuil réactogène plus bas (Flinterman et al., 2006; Moneret-Vautrin, 2011). L'éviction n'est plus suffisante pour la sécurité des sujets les plus allergiques.

5.2. Les formules hypoallergéniques

Les formules hypoallergéniques (HA) sont souvent utilisées durant les six premiers mois de la vie chez les nourrissons à haut risque d'allergie. Les plus courantes sont les préparations pour nourrissons partiellement hydrolysées, préparées à partir de différentes fractions telles que le lait entier, les protéines de lactosérum ou les caséines, largement hydrolysées et les formules à base de soja (Walker-Smith, 2003; Isolauri et Sampson, 2004). Cependant cette dernière alternative n'est pas toujours adéquate et peut conduire à des réactions croisées (Addou et al., 2016) ainsi que d'autres dangers causés par les phytoestrogènes (Agostoni et al., 2006).

Les laits à base d'autres protéines de lait animales (chèvre, brebis, jument, ânesse, chamelle) sont également contre-indiqués, en raison du risque élevé de réaction croisée et de leur composition nutritionnelle inadéquate pour les nourrissons (Sicherer, 2001; Fiocchi et al., 2010).

5.3. Les traitements médicamenteux

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

Le traitement de l'APLV comprend un antihistaminique oral pour les réactions cutanées ou digestives et un auto-injecteur d'épinéphrine pour les réactions systémiques ou respiratoires (Benhamou et al., 2010).

Le traitement d'urgence en cas de choc anaphylactique repose sur la prise d'adrénaline (Niggemann et Beyer, 2012; Murano et al., 2014). Cette hormone induit une vasoconstriction périphérique et agit sur le rythme cardiaque. Elle exerce également une action relaxante sur les muscles bronchiques et inhibe la libération des médiateurs de l'inflammation et de l'allergie.

5.4. Immunothérapie spécifique

La majorité des allergies graves sont IgE-dépendantes, ce qui justifie l'instauration de nouvelles approches thérapeutiques, autres que l'éviction. Ces dernières regroupent l'immunothérapie spécifique par voie orale, sublinguale et épicutanée (Nowak-Wegrzyn et Sampson, 2011).

L'immunothérapie constitue un progrès majeur dans le traitement de l'APLV. Certaines techniques sont rentrées dans la pratique courante, d'autres sont encore émergentes, et constituent donc des perspectives d'évolution (Bidat, 2011).

L'immunothérapie par voie orale (ITO), ou l'induction de la tolérance orale, consiste à la prise per os de quantités très faibles puis croissantes d'allergènes alimentaires. Les premières études sur l'ITO ont concerné le lait de vache, les œufs de poule puis l'arachide (Sabouraud-Leclerc, 2013), avant de s'étendre à l'ensemble des allergènes alimentaires.

Cependant, l'immunothérapie orale (ITO) est souvent associée à des effets secondaires très importants et peu de patients développent une tolérance (Ponce et al., 2016; Trendelenburg et Blümchen, 2016).

L'immunothérapie par voie sublinguale (ITSL), a montré quelques résultats positifs pour les allergies alimentaires. Cette technique est basée sur de faibles quantités d'allergènes à mettre en contact avec les cellules de Langerhans présentes dans la muqueuse buccale (Mousallem et Burks, 2012; Novak et al., 2010). S'ensuit une immunomodulation via les cellules dendritiques et les lymphocytes T régulateurs. L'IT sublinguale connaît peu de réactions indésirables, mais n'obtient pas une efficacité convaincante (Keet et al., 2012).

L'ITSL n'est pour le moment pas recommandée dans l'allergie alimentaire, et son efficacité semble plus modeste que la désensibilisation par voie orale (Jones et al., 2014).

Enfin, une immunothérapie spécifique par voie épicutanée s'est développée ces dernières années. Celle-ci consiste à appliquer l'allergène en contact avec la peau et les cellules langerhansiennes de l'épiderme. Cette approche semble prometteuse, notamment pour les APLV sévères ou comme première étape avant l'ITO. Des études avec de grands échantillons sont nécessaires pour mieux juger de son efficacité.

Des preuves sur l'efficacité et la sécurité d'utilisation de ces nouvelles approches thérapeutiques restent encore à démontrer avant leur mise en place dans la pratique courante.

5.5. Autres thérapies

D'autres traitements non spécifiques incluent l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-IgE qui aident à réduire le taux des anticorps IgE libres dans le sang, chez les patients allergiques. Ceci conduit à une réduction de l'activité des basophiles et une augmentation de la dose seuil (Nowak-Wegrzyn et Sampson, 2011).

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour les allergies alimentaires qui induirait une tolérance vis-à-vis des aliments incriminés (Ponce et al., 2016).

De nos jours, l'une des voies les plus convoitées de la médecine traditionnelle est l'administration de substances immunomodulatrices pour le traitement de nombreuses maladies telles que les herbes chinoises FAHF-2 (Srivastava et al., 2005), *Lycopus lucidus* (Shin et al., 2005), Camomille allemande (*Matricaria recutita*) (Chandrashekhar et al., 2011) et certains composants pharmacologiquement actifs de la gelée royale (Okamoto et al., 2003; Vucevic et al., 2007).

6. L'apiculture en Algérie

Il y a deux types d'abeilles en Algérie: l'abeille d'Algérie, très proche de l'abeille noire d'Europe, qui est très robuste et bien acclimatée «**Tellienne**» et l'abeille jaune (*Apis mellifera sahariensis*) connue sous le nom de la «**Saharienne**». L'Algérie dispose d'une abondante flore mellifère subspontanée et cultivée. A l'exception des régions désertiques des hauts plateaux et du sud, l'apiculture est, en Algérie, largement pratiquée dans les régions montagneuses à population dense (Kabylie, Aurès) dans les plaines littorales (Mitidja), dans les plaines intérieures (Mascara) et dans les vallées des grands oueds (Soummam) (Hussein, 2001).

En 2010, l'industrie de l'apiculture en Algérie comptait environ 1,2 million de colonies dans la région médio-septentrionale de l'Algérie, comprenant les zones agricoles d'Alger, de Blida et de Boumerdès, là où l'apiculture intensive est pratiquée (Adjlane et al., 2012). Il existe des arbres fruitiers dans ces régions et une grande variété de plantes. L'apiculture est pratiquée surtout dans le nord du pays où la flore mellifère fournit une miellée pendant presque toute l'année (Hussein, 2001). L'abeille locale est appelée *Apis mellifera intermissa* (Adjlane et al., 2012). Sa position systématique est présentée dans le tableau 1.

De nombreux produits sont élaborés par les abeilles dont la gelée royale, le miel, le pollen, la propolis, la cire d'abeille.

7. La gelée royale

La gelée royale est un produit crémeux sécrété par les abeilles nourrices pour nourrir la reine (Münstedt et Von Georgi, 2003). Celle-ci vit cinq ans au lieu de six semaines en moyenne pour une ouvrière et pond jusqu'à 2000 œufs par jour. Cette longévité incroyable et cette productivité hors du commun lui sont conférées par la gelée royale. Elle est entièrement synthétisée par les abeilles dans les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires (Simuth, 2001; Srisuparbh et al., 2003; Huang et al., 2012). Elle est dérivée des protéines et des nutriments présents dans le pollen ingéré par les abeilles nourrices.

Tableau 1. La position systématique d'abeille d'espèce *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906).

Embranchement	Arthropodes
Sous embranchement	Mandibulates
Classe	Insectes
Sous-classe	Ptérygotes
Ordre	Hyménoptères
Sous-ordre	Apocrites
Section	Aculéates
Famille	Apidés
Genre	<i>Apis</i>
Espèce	<i>Apis mellifera</i>
Sous espèce	<i>intermissa</i>

7.1. Origine

La gelée royale est distribuée aux jeunes larves pendant 2 à 3 jours, les larves d'ouvrières recevant par la suite un mélange de pollen et de miel. Si une de ces larves continue de recevoir uniquement de la gelée royale, elle donnera naissance après la nymphose à une reine, qui est nourrie à la gelée royale toute sa vie (Simuth, 2001; Boselli et al., 2003; Srisuparbh et al., 2003; Ferioli et al., 2014; Wang et al., 2016).

Les abeilles produisent exclusivement la quantité nécessaire à leurs besoins et ne font pas de réserve comme avec le miel. La gelée royale est donc d'un produit noble de production très limitée et de très haute valeur ajoutée. Son obtention nécessite un important travail qui justifie un prix de vente élevé.

En effet, la récolte se fait dans une ruche aménagée avec une partie sans accès pour la reine. Des cadres sont alors placés à l'intérieur de la ruche avec des ébauches de cellules royales artificielles dans lesquelles l'apiculteur a déposé des larves d'ouvrières âgées de 12 à 36 heures. Les ouvrières vont alors donner à ces ébauches de cellules, la taille définitive des cellules de reines, tandis que les nourrices vont sécréter de la gelée royale en abondance pour nourrir ces jeunes larves (Ballot Flurin, 2009) (figure 5). Après trois jours, les cellules ont atteint leur maximum d'abondance en gelée royale (Lercker et al., 1985). Les cadres sont alors enlevés, les larves sont soigneusement retirées des cellules et la gelée royale est récoltée à l'aide d'une spatule, ou avec un petit aspirateur. C'est un travail extrêmement précis et demandant un savoir faire subtil (Ballot Flurin, 2009).

7.2. Compositions chimiques

La composition de la gelée royale est différente suivant qu'elle est destinée aux larves d'abeilles ouvrières ou aux larves de reines.

Les relations quantitatives entre les différents composants de ce produit peuvent être variables et dépendent de nombreux facteurs, y compris l'origine, la race de l'abeille (Shibi et al., 1993; Jianke et al., 2003; Lian-Fei, 2016), l'alimentation et l'âge des larves greffées (Sahinler et Kaftanoglu, 1997), l'âge de l'ouvrière (Ali, 1994), l'intervalle de récolte et le nombre de coupes de la reine greffées (Ali, 1994; Sharaf El-Din, 2010; Ali, 2017), la saison, les conditions régionales et le type de flore pollinifère (Wongchai et Ratanavalachai, 2002; Ramadan et Al-Ghamdi, 2012), avec des variations affectant les lipides, les protéines, les acides aminés et des vitamines.



Figure 5. Larve de la reine baignant dans de la gelée royale (Blanc, 2010).

Il n'existe pour l'instant aucune norme standard au niveau international concernant la composition de la gelée royale malgré l'existence de certaines normes nationales dans certains pays comme la Suisse, le Japon, le Brésil et la Bulgarie (Bogdanov, 2011). Cependant, l'International Honey Commission a publié en 2009 un article sur la standardisation de la composition de la gelée royale en vue de l'élaboration des normes applicables à l'échelle internationale en se basant sur des analyses de la gelée royale provenant de plusieurs pays (dont l'Italie majoritairement) (Sabatini et al., 2009).

La composition moyenne générale de la gelée royale est décrite dans la figure 6.

7.2.1. Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques de la gelée royales sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Propriétés organoleptiques (D'après Popescu et al., 2008a).

Forme	Gélatineuse, crémeuse
Couleur	De jaunâtre à blanc, devient plus jaunâtre après un long stockage.
Odeur	Acide et forte, rappelant le phénol.
Goût	Acide à doucereux (pH entre 3 et 4)
Défauts	Après un long stockage, la couleur de la gelée royale devient jaune et son goût peut devenir rance

7.2.2. Teneur en eau

La teneur en eau de la gelée royale fraîche s'élève à une proportion allant de 60 à 70% (Pourtallier et al., 1990; Lercker, 2003; Garcia-Amoedo et Almeida-Muradian, 2007).

D'ailleurs l'insolubilité de certains composés peut expliquer les variations de la teneur en eau (Sabatini et al., 2009). Elle est déterminée par dessiccation dans une étuve ou selon la méthode de Karl Fischer.

7.2.3. Glucides

Les glucides représentent en moyenne 30% de la matière sèche de la gelée royale (Sabatini et al., 2009).

On retrouve toujours deux glucides majoritaires que sont le fructose et le glucose qui représentent 90 % des glucides; le fructose étant toujours majoritaire. Dans une moindre mesure, le saccharose est quant à lui, toujours présent mais à des concentrations très variables. On peut également retrouver des oligosaccharides (tels que le trehalose, le maltose, le gentiobiose, l'isomaltose, le raffinose, l'erlose ou le mélézitose). Bien que présents en petites quantités, l'analyse du spectre de ces sucres permet, tout comme pour le miel, d'en assurer l'authenticité (Lercker et al., 1986; Sabatini et al., 2009; Melliou et Chinou, 2014).

7.2.4. Protéines et acides aminés

La gelée royale est très riche quantitativement et qualitativement en protéines et en tous les acides aminés essentiels et semi-essentiels. Environ 80% des protéines de la gelée royale sont représentées par un groupe de 9 protéines: MRJP (major royal jelly proteins) (Albert et Klaudiny, 2004; Drapeau et al., 2006; Schonleben et al., 2007; Gharbi, 2011).

D'un point vu quantitatif, les protéines représentent environ (27-41%) la plus importante portion du poids sec de la gelée royale (Simuth, 2001). Les acides aminés qui sont présentes en forte quantité sont: prolines, lysine, acide glutamique, B-alanine, phénylalanine, acide aspartate et serine (Boselli et al., 2003). La détermination des protéines est effectuée par dosage de l'azote.

7.2.5. Lipides

La gelée royale contient exclusivement des acides gras libres aux structures peu habituelles (80-90% du poids sec de la fraction lipidique), par contre les triglycérides et les diglycérides sont absents. L'acide 10-hydroxy-trans-2-décénoïque (10H2DA) représente l'acide gras le plus important. Sa teneur est comprise entre 1,98 et 6,37% (Melliou et Chinou, 2005; Gharbi, 2011; Melliou et Chinou, 2014). Cet acide gras joue un rôle important dans les propriétés biologiques de la gelée royale (rôle antibactérien, immunomodulateur, antifongique et immunostimulant) (Amigou, 2016).

La gelée royale contient également des acides gras volatils, des stérols, des lipides neutres et des hydrocarbures avec une proportion de 10% (Amigou, 2016).

7.2.6. Acides totaux

Les acides totaux représentent 30-60g/100g. Leur teneur est déterminée par titrage avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,1 mol/l) (Ivanov et Mitev, 1981; Karaali et al., 1988; Serra Bonvehi et al., 1992).

7.2.7. Minéraux

La gelée royale est riche en minéraux qui sont en quantité moindre que celle contenue dans le pollen. La gelée royale a montré un panel important de substances minérales (Stocker et al., 2005) dont:

- Calcium, Fer, Potassium, Soufre, Magnésium, Phosphore, Sodium, Zinc, Cuivre, Manganèse, Aluminium, Baryum, Strontium, Bismuth, Cadmium, Mercure, Plomb, Antimoine.
- Tellurium, Thallium, Tungstène, Etain, Chrome, Or, Nickel, Titanium, Vanadium, Cobalt, Molybdène en infimes quantités.

7.2.8. Vitamines

La gelée royale est très riche en différentes vitamines, particulièrement les vitamines du groupe B qui sont toutes présentes, surtout la vitamine B5 (acide pantothénique). On en trouve également de la vitamine C sous forme de traces. Les vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, E et K sont quant à elles présentes en quantités négligeables (Bogdanov, 2011; Gharbi, 2011) (tableau 3).

7.2.9. La cendre

La teneur en cendres représente 0,8-3% de la matière fraîche de la gelée royale (Messia et al., 2005).

7.2.10. Pigments

La gelée royale possède quelques flavonoïdes comme la catéchine et l'épicatéchine (Gharbi, 2011).

7.2.11. Autres

La gelée royale contient ainsi des substances actives comme:

- Des enzymes (glucose-oxydase, un précurseur de l' α -glucosidase et la glucose déshydrogénase (Han et al., 2011).
- L'acétylcholine en très forte quantité (1mg/g) (Domerego et al., 2009) reconnue pour son effet vasodilatateur. Cette action justifie son utilisation dans certains troubles circulatoires.
- Facteurs antibactériens (Domerego et al., 2009) .
- Hormones sexuelles: œstradiol, testostérone, progestérone (Domerego et al., 2009).
- Facteurs hypoglycémiant et hyperglycémiant (Apimondia, 2001).
- Substances similaires aux citoquinines et gibbérellines (Apimondia, 2001).
- Gélatine: précurseur du collagène (Gharbi, 2011).

- Acides nucléiques: ADN et ARN (Gharbi, 2011).
- Néoptérine (Gharbi, 2011).

8. Utilisation

La gelée royale est un produit précieux de la ruche qui peut être utilisé à la fois comme supplément nutritionnel (diététique) et comme médicament. Ces propriétés en font un complément utile au traitement de nombreuses maladies, autant pour soutenir le moral que pour lutter contre les virus. Elle est aussi recommandée comme stimulant sexuel et pour le traitement des troubles de la ménopause (réduction des bouffées de chaleur, une amélioration de la fatigue, de la sécheresse vaginale et des maux de tête liés à la ménopause (Szanto et al., 1994; Georgiev et al., 2004; Ballot Flurin, 2009).

Des travaux récents ont montré que l'usage de la gelée royale dans le soin des ulcères du pied chez des patients diabétiques favorise la cicatrisation (Abdelatif et al., 2008; Siavash et al., 2011).

En usage traditionnel, la gelée royale est utilisée pour le traitement des états de fatigue (asthénies chroniques chez les personnes âgées), anorexies, retards de croissance grâce à son activité eupeptique et régulatrice des troubles digestifs fonctionnels et des états de "mal-être" en général sans raison médicale apparente et décelable.

Enfin, la gelée royale est naturellement très riche en vitamine B5 (acide pantothénique); elle est donc recommandée pour les problèmes de phanères (peau et ongles fragiles, chute anormale ou prématurée des cheveux et certaines dermatoses) (Kirk et Othmer, 1994).

La gelée royale est contre-indiquée chez les personnes allergiques aux produits de la ruche. Ainsi une dose trop forte et trop prolongée peut provoquer des troubles hormonaux (Toth, 1965; Viuda-Martos et al., 2008; Ballot Flurin, 2009).

9. Conservation de la gelée royale

La gelée royale fraîche doit être conservée au froid (entre 2 et 5°C) dans des pots en verre hermétiquement fermés par un bouchon en plastique (le métal est attaqué car la gelée royale est acide) protégés de la lumière (Donadieu, 1981; Alphantery, 2002). Dans de telles conditions, la gelée royale se conserve parfaitement pendant plusieurs mois. En effet, la gelée royale est sensible à l'air, à la chaleur et à la lumière. A l'air, elle perd facilement son eau et s'oxyde en brunissant, et la chaleur provoque diverses altérations et favorise la croissance de certaines moisissures (Millet, 2006).

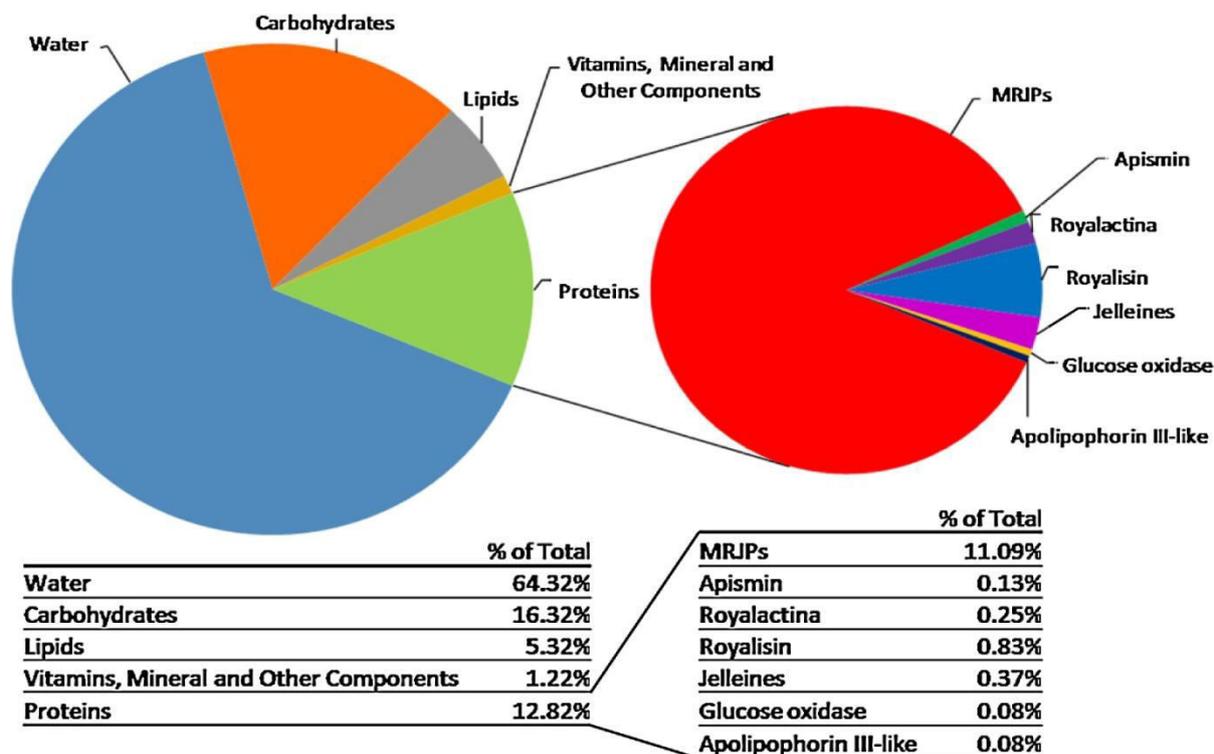


Figure 6. Composition moyenne de la gelée royale (Fratini et al., 2016).

Tableau 3. Principales vitamines identifiées dans gelée royale (Xue et al., 2017).

Vitamine dans la gelée royale	mg/100g
Vitamine A	1,10
Vitamine E	5,00
Vitamine B1	2,06
Vitamine D	0,2
Vitamine B2	2,77
Vitamine B6	11,90
Vitamine B12	0,15
Vitamine B5 (Acide Pantothénique)	52,80
Niacine (PP)	42,42
Vitamine C (Acide Ascorbique)	2,00
Vitamine B9 (Acide Folique)	0,40

On peut également la trouver lyophilisée sous forme de gélules ou de capsules mais ainsi, elle perd une partie de ses propriétés par l'évaporation de ses composants volatiles, sa conservation ne demande alors aucune précaution particulière (Adam, 1985).

10. La production mondiale de la gelée royale

La production de la gelée royale en France est d'environ 1-2 tonnes par an. En raison de la forte demande intérieure, la France doit importer de grandes quantités de gelée royale, principalement à partir la Chine.

En effet, la Chine est sans aucun doute le plus grand producteur de gelée royale (Li et al., 2007). La production chinoise de la gelée royale est estimée à 2000 tonnes/an où des techniques plus sophistiquées sont associées à des sélections génétiques (une quantité qui représente plus de 60% de la production mondiale), dont quasi-totalité est exportée vers le Japon, les États-Unis et en Europe, Cette production a un prix très compétitif sur le marché mondial (Sabatini et al., 2009). Cependant, à l'heure actuelle, les chiffres sur la production de la gelée royale ne sont pas disponibles à l'échelle nationale.

D'autres pays comme la Corée, Taiwan et le Japon sont aussi considérés comme des producteurs et exportateurs très importants.

11. Propriétés générales de la gelée royale

La gelée royale possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet d'en identifier plusieurs. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique la gelée royale. Nous ne parlerons dans ce mémoire que des propriétés les mieux connues et les plus souvent rencontrées.

De nombreuses études ont montré les différentes activités pharmacologiques de la gelée royale. En effet, elle possède un pouvoir vasodilatateur (Shinoda et al., 1978), antimicrobien (Fontana et al., 2004; Boukraa, 2008; Melliou et Chinou, 2014), anti-inflammatoire (Kohno et al., 2004), hypocholestérolémiant (Viuda-Martos et al., 2008; Kashima et al., 2014; Chiu et al., 2017), hépato-protecteur (Zimmermann, 2002; Uzbekova et al., 2006; El-Nekeety et al., 2007), mais aussi des effets antioxydants et immunomodulateurs (Sver et al., 1996; Nagai et al., 2006; Gasic et al., 2007; Liu et al., 2008).

11.1. Activité antioxydante et anti-inflammatoire

La gelée royale ralentit les effets du vieillissement cutané grâce à sa richesse en produits antioxydants. Elle contient des oligoéléments et des vitamines qui jouent un rôle protecteur

vis-à-vis des radicaux libres. En plus de la vitamine C, la gelée royale contient de la vitamine E à l'état de trace qui possède des propriétés anti-radicalaires et anti-inflammatoires, expliquant son action protectrice contre les effets nocifs du soleil (Martini et Seiller, 2006).

Karaca et al. (2010) a montré que la gelée royale avait un effet bénéfique chez le rat souffrant de colite induite par l'acide acétique. Ce dernier provoque des lésions des intestins à l'origine de diarrhée, d'inflammation et d'hémorragie ainsi que d'afflux de mastocytes. L'ingestion par voie orale de la gelée royale diminue les ulcérations intestinales et limite la présence des mastocytes. Le mécanisme d'action de la gelée royale n'est pas élucidé dans cette étude. Cependant, la gelée royale semble être une piste de nouveaux principes actifs dans les inflammations intestinales.

En outre, Kohno et al. (2004) a suggéré que la gelée royale a des actions anti-inflammatoires par l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés.

11.2. Activité antitumorale

L'effet antitumoral de la GR a été bien étudié sur des modèles expérimentaux. Cependant, il n'y a eu aucune étude comparable chez l'homme.

Les effets de la gelée royale sur le développement tumoral et les métastases dans les modèles de tumeurs murines ont été étudiés (Oršolić et al., 2003). Ces résultats ont démontré que les produits de la gelée royale administrés par voie orale ou systémique peuvent jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance tumorale et des métastases. Les auteurs supposent que l'acide 10-hydroxy-2-décanoïque (10H2AD) soit impliqué dans cet effet inhibiteur de la formation des métastases.

Une étude récente a mis en évidence l'action antitumorale de la GR. En effet, l'acide 10-hydroxy-2-décanoïque (10-HAD) contenu dans la GR exerce une action inhibitrice de l'angiogenèse induite par le VEGF (vascular endothelial growth factor), bloquant ainsi la prolifération et la migration des cellules ce qui entraîne l'inhibition de la vascularisation de la tumeur (Izuta et al., 2007).

La gelée royale contient aussi l'apalbumin-1 et l'apalbumin-2, deux protéines majeures qui stimulent la synthèse de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) par les macrophages (Šimúth et al., 2004).

De plus, la RJP30, une autre fraction protéique de la GR, joue également un rôle antitumoral. Cette protéine exerce une action cytotoxique sur les cellules du carcinome utérin,

diminuant ainsi 2,5 fois la densité initiale des cellules après 7 jours de traitement (Salazar-Olivo et Paz-González, 2005).

11.3. Effet immunomodulateur et antiallergique de la gelée royale

Jusqu'à présent, la plupart des effets immunomodulateurs de la gelée royale ont été attribués à ses composants protéiques, en particulier la protéine majeure de la gelée royale 3 (MRJP 3) (Fang et al., 2010; Kohno et al., 2004) et apalabumin 1 (Majtan et al., 2006).

La MRJP 3 a été décrite comme la composante anti-inflammatoire et immunosuppressive dominante de la gelée royale car elle supprime la production de cytokines (en particulier l'IL4) des lymphocytes T (Kohno et al., 2004; Okamoto et al., 2003) qui favorisent la réponse anti-allergique (Okamoto et al., 2003).

Les études de Gasic et al. 2007 et Vucevic et al. 2007 menées in vitro chez le rat ont montré que les acides gras à chaîne courte de la gelée royale (contenant 8-12 atomes de carbone) ont une activité modulatrice sur les cellules immunitaires et que l'acide gras majeur, l'acide 10-hydroxy-2-décanoïque (10-HDA) de la gelée royale était principalement immunosuppresseur par la diminution de la prolifération des cellules T et la diminution de la production d'interleukine (IL12) par les cellules dendritiques de la rate.

En revanche, Il y a peu de travaux qui montrent l'effet immunomodulateur de la gelée royale entière.

Matériels et Méthodes

1. Produits chimiques, réactifs et matériels utilisés

Les différents produits chimiques et réactifs utilisés pour les dosages physico-chimiques et immunoenzymatiques proviennent de chez Sigma, Merck et Prolabo (France). La fraction pure de la β -Lactoglobuline bovine est fournie par Sigma (France). Le matériel utilisé pour la technique Elisa provient de chez Labsystem. La chambre de Ussing est obtenue auprès de Physiologic Instruments (San Diego, CA, USA).

2. La gelée royale

La gelée royale, utilisée dans le cadre de ce travail, est fraîchement récoltée, de ruche d'abeilles de race *Apis mellifera intermissa*, dans la région de cheffa (Blida) et la région de Boumerdès tout en respectant les conditions d'hygiène (figure 7). Dès sa récolte, la gelée royale est mise en flacons de verre propres, secs et sombres et fermé hermétiquement à une température de 2 à 4°C.

3. Etudes physico-chimiques de la gelée royale

3.1. Détermination du pH (d'après Popescu et al., 2008b)

1g de la gelée royale est pesé et dissout dans 15 ml d'eau distillée. La solution obtenue est bien agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur. Le pH de cette solution est ensuite mesuré en plongeant la pointe de l'électrode du pH-mètre préalablement étalonné. La valeur du pH affichée est notée après stabilisation.

3.2. Teneur en eau (d'après Popescu et al., 2008b)

0,5g d'échantillon est pesé à l'aide d'une balance analytique puis mis dans une capsule en porcelaine à fond plat de 5-6 cm de diamètre et mis à sécher dans une étuve réglée à température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes jusqu'à obtention d'un poids constant. Une fois retirées de l'étuve, les capsules sont placées dans un dessiccateur puis pesées à l'aide d'une balance analytique, après refroidissement.

3.2.1. Expression des résultats

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Eau \%} = \frac{(M-M1)}{(M-M2)} \times 100$$

M : Poids de la capsule et de l'échantillon (g).

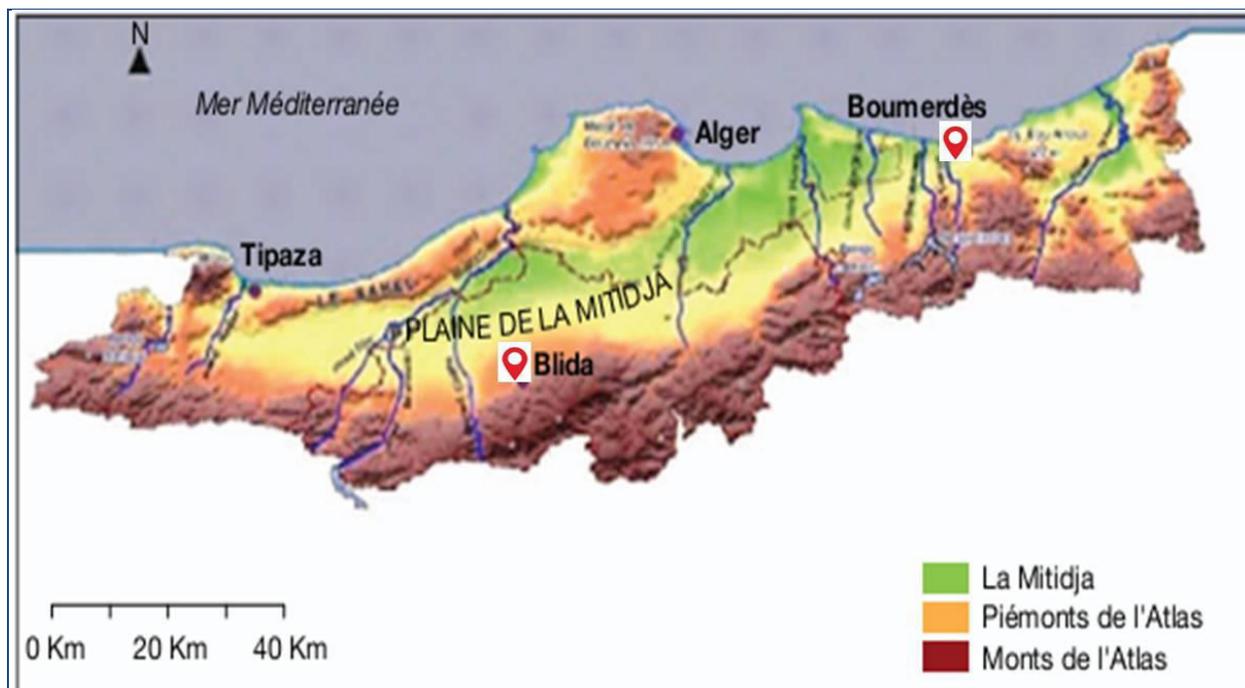


Figure 7. Présentation de la zone d'étude.

Source: Programme d'aménagement côtier (PAC), 2006.

M1 : Poids de la capsule et de l'échantillon après séchage (g).

M2 : Poids de la capsule vide (avant l'ajout de l'échantillon) (g).

$$\text{Matière sèches \%} = 100 - H \%$$

H% : Teneur d'eau (%).

3.3. Détermination de la teneur en matière minérale totale (ou cendres brutes)

3.3.1. Principe

La teneur en cendre d'une denrée s'obtient par incinération (ou combustion complète) dans un four à 550 – 800°C. Elles contiennent tous les éléments minéraux.

3.3.2. Mode opératoire

Dans un creuset propre et sec, 1g de la gelée royale est pesé à l'aide d'une balance analytique. Les creusets contenant l'échantillon sont introduits dans un four d'incinération à 550°C pendant 1 heure 40 minutes (Popescu et al., 2008b).

3.3.3. Expression des résultats

La teneur en cendre est déterminée selon la formule suivante:

$$C\% = \frac{m1-m2}{P} \times 100$$

P : Poids de l'échantillon (g).

m1 : Poids du creuset et de la cendre (g).

m2 : Poids du creuset vide (avant l'ajout de l'échantillon) (g).

3.4. Détermination de l'acidité

La titration de l'acidité se fait avec une solution de NaOH en présence d'un indicateur acide-base (Bonvehi, 1992).

0,5g de la gelée royale est pesé dans un pilulier à l'aide d'une balance analytique, puis 2 gouttes de phénolphthaléine sont ajoutées et le mélange est titré avec une solution de NaOH 0,1 N jusqu'à obtention d'une coloration rose pâle persistante une dizaine de secondes.

3.4.1. Expression des résultats

L'acidité est calculée selon la formule suivante:

$$\text{L'acidité} = V \times 1 / 0,5$$

V : Volume de NaOH 0,1N utilisé pour la titration (ml).

0,5 : Poids de prise d'essai en (g).

Les résultats sont exprimés en : ml 0,1N NaOH /g.

3.5. Dosage des protéines

Afin de vérifier la méthode la plus fiable pour la détermination des protéines totales sur des échantillons de la gelée royale pure, 2 méthodes différentes de dosage de protéines sont utilisées: la méthode de Kjeldahl et la méthode de Lowry et al. (1951).

3.5.1. Détermination de la teneur en azote total (Méthode de Kjeldahl) (d'après AOAC, 1980; Kanelis et al., 2015).

3.5.1.1. Le principe

La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments. Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique à chaud en présence d'un catalyseur approprié puis une distillation de l'ammoniac libéré suivie d'une titration de la solution obtenue à l'aide d'un acide faible. La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s'effectue en trois étapes (voir annexe 1).

3.5.1.2. Mode opératoire

0,5g d'échantillon sont mis dans un matras de minéralisation ainsi qu'une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium), auxquels 15ml d'acide sulfurique pur sont ajoutés. Le mélange est chauffé en faisant monter progressivement la température.

La minéralisation s'achève lorsque la solution devient limpide. Elle dure environ 5h. Le minéralisât est refroidi puis distillé. Pendant la distillation, les ions ammonium étaient convertis en gaz ammoniac en présence de NaOH (30% en poids/volume). Le distillat se condense dans une solution contenant 10ml d'acide borique (H_2BO_2) à 4% et 3 gouttes de réactif de Tashiro. Enfin, le dosage de l'ammoniac se fait par une solution d'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Le volume (chute de burette) est noté.

Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans échantillon.

3.5.1.3. Expression des résultats

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante:

$$N\% = \frac{0,014 \times 0,1 (V_2 - V_1)}{PE} \times 10$$

PE : Masse de prise d'essai en gramme

V_2 : Volume d'HCl à partir du quel l'indicateur vire du vert au rose

V_1 : Volume d'HCl utilisé pour le dosage blanc

0,1 = Titre de la solution d'acide chlorhydrique

0,014 = Poids molaire de l'azote 10^{-3}

La teneur en protéine est calculée en multipliant la teneur en azote total N (%) par le coefficient 6,25.

La teneur en protéines de la gelée royale est obtenue en utilisant l'équation suivante (2):

$$\text{Teneur en protéines} = 6,25 \times N\%$$

3.5.2. Dosage des protéines totales selon la méthode de Lowry et al 1951

3.5.2.1. 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 Cioalceus phenol. Folin-Cioalceu) par les résidus tyrosine tryptophane et cystéine des protéines en milieu alcalin pH à peu près égal à 10 (Lowry et al., 1951). Cette réduction se traduit par une coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon.

3.5.2.2. Mode opératoire

0,05g de la gelée royale est dissous dans 10 ml d'eau bidistillée puis centrifugés à 2300 g pendant 25 min. Le réactif de Folin-Cioalceu est ensuite ajouté au surnageant. La concentration

des protéines totales est déterminée par mesure de l'absorbance en spectrophotométrie à 750 nm en comparaison à une courbe étalon obtenue avec le sérum albumine bovine (SAB).

3.6. L'extraction des protéines brutes de la gelée royale

Les protéines brutes de la gelée royale sont extraites selon la méthode de Salazar-Olivo et Paz-Gonzalez (2005). 0,05g de la gelée royale est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée puis centrifugée à 15000g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et dialysé pendant toute une nuit à l'aide d'une membrane de dialyse immergée dans de l'eau distillée à 4 °C avec une agitation continue.

3.6.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse nous permet de séparer et d'identifier les protéines de la gelée royale. Nous utilisons la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes avec le β -mercaptoéthanol et sans le β -mercaptoéthanol, selon la méthode de Laemmli (1970).

3.6.1.1. Principe

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) est caractérisée par son haut degré de résolution. Elle permet la séparation rapide et sensible des protéines selon leur poids moléculaire. Le mélange de protéines est tout d'abord dissout dans une solution de SDS, détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une charge négative en enveloppant la structure primaire des polypeptides. Le mercaptoéthanol est également ajouté afin de réduire les liaisons disulfures. La charge négative acquise par la fixation du SDS est habituellement beaucoup plus grande que la charge des protéines natives. Les complexes SDS-protéines dénaturées sont ensuite soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide.

3.6.1.2. Mode opératoire

Dans la méthode de séparation par SDS-PAGE nécessite la préparation de deux types de gel: Un gel de séparation (12% d'acrylamide) qui permet de fractionner les différentes protéines et les sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration (5% d'acrylamide) permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines (tableau 4).

Les protéines brutes de la gelée royale sont dissoutes dans le tampon d'échantillon (tableau 5) en présence ou en l'absence de l'agent réducteur β -mercaptoéthanol. Un volume de 20 μ l de chaque échantillon est déposé dans les puits à l'aide d'une seringue Hamilton.

Tableau 4. Composition de gel de séparation et de gel de concentration.

Solutions	Gel de séparation 12%	Gel de concentration 5%
Acrylamide 40%	1 ml	0,2 ml
Tris 2M pH 8.8	0,665 ml	-
Tris-HCl 50 mM pH 6,8	-	0,3 ml
H ₂ O	2,335 ml	2 ml
SDS 10%	40 µl	25 µl
APS 10%	40 µl	20 µl
Temed	8 µl	4 µl

Tableau 5. Composition du tampon d'échantillon.

Composition
Tris-HCl 50 Mm pH 6,8
SDS 4%
β-mercaptoéthanol 3%
Glycérol 10%
Traces de bleu de bromophénol

Les protéines migrent sous tension de 80 volts dans un tampon de migration (tableau 6) jusqu'à ce que le front de migration marqué par le bleu de bromophénol contenu dans le tampon de migration ait parcouru la hauteur du gel. Le gel est ensuite démoulé et mis dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) à 10%.

Les protéines sont révélées par une solution de coloration, contenant du bleu de Coomassie R250 (tableau 7), et une solution de décoloration (tableau 8). Les bandes sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J.

3.7. Le dosage des glucides par la méthode de Bertrand

3.7.1. Principe

La méthode de dosage réductimétrique est basée sur la réduction de la liqueur de Fehling par les glucides réducteurs en milieu alcalin à chaud. Cette technique ancienne est encore utilisée pour les dosages des glucides dans les aliments. Il s'agit de la méthode d'analyse qui est plus précise que la méthode de Fehling.

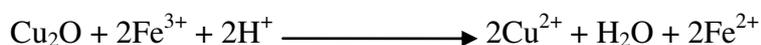
Elle utilise le caractère réducteur des sucres. La liqueur cupro-tartrique est réduite dans des conditions précises. L'oxyde de Cu_2O formé est recueilli, on le fait agir sur des ions du sulfate ferrique en excès qui partiellement réduit en sulfate ferreux que l'on dose par permanganate de potassium. La réaction doit se dérouler à chaud pendant 3 min à partir de l'ébullition (Audigie et al., 1984).

Le dosage se déroule en trois étapes:

➤ **Réduction de la liqueur de Fehling par les glucides réducteurs.**



➤ **Oxydation du précipité de Cu_2O par une solution ferrique (Fe^{3+})**



➤ **Dosage des ions fer formés par manganimétrie**



3.7.2. Mode opératoire

Dans un erlenmeyer de 250 ml: Préparer un mélange cupro-alcalin à partir de 20 mL de la

Tableau 6. Composition du tampon de migration.

Composition	
	Tris 50 Mm
	Glycine 0,384 M
	SDS 0,1%

Tableau 7. Composition de la solution de coloration.

Bleu de Coomassie R250	0,2g
Ethanol 96 %	90ml
Acide acétique	20ml
Eau distillée	90ml

Tableau 8. Composition de la solution de décoloration.

Acide acétique glaciale	10 ml
Ethanol 96 %	90 ml
Glycérol	10 ml
Eau distillée	90 ml

solution cuivrique (liqueur de Fehling A) et de 20 ml de la solution tartro-sodique (liqueur de Fehling B) aux quelles sont ajoutés 10 mL de la solution à doser de la gelée royale à 10% puis 10 mL d'eau distillée. Quelques billes en verre sont ajoutées comme régulateur d'ébullition. Le tout est porté à ébullition pendant 3 min puis laissé refroidir. Il en résulte la formation de l'oxyde cuivreux Cu_2O qui est filtré sous vide à l'aide d'un erlen à vide et d'un entonnoir à verre fritté (Büchner) de porosité 4. L'oxyde cuivreux formé est dissout à l'aide d'une solution de liqueur ferrique et la solution récupérée avec le permanganate de potassium à 0,1N est analysée.

3.7.3. Expression des résultats

Le résultat est déduit d'une table établie expérimentalement par G. Bertrand (annexe 2) qui relie la quantité de cuivre isolé à celle des glucides. La manipulation consiste donc à déterminer la masse de cuivre (Audigie et al., 1984).

3.8. Teneur en matière grasse (Bobiş et al., 2010)

3.8.1. Principe

Les corps gras sont des substances organiques qui peuvent être extraites par des solvants organiques non polaires au moyen de l'appareil Soxhlet.

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

3.8.2. Mode opératoire

5 g de la gelée royale sont introduits dans une cartouche à extraction exempte de matières grasses et recouverte d'un tampon de coton dégraissé. La cartouche est placée dans un extracteur « Soxhlet ». L'extraction se fait pendant 4 h avec un solvant d'éther diéthylique qui est versé dans un ballon sec muni de quelques billes en verre. Le tout est placé sur un chauffe-ballon réglé à 45°C.

Après l'extraction, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à 45°C, puis le résidu est séché pendant 30 min dans une étuve à 105°C. Après refroidissement dans un dessiccateur, le ballon est pesé. L'opération de séchage est répétée jusqu'à obtention d'un poids constant.

3.8.3. Expression des résultats

La teneur en matière grasse est déterminée selon la formule suivante:

$$\text{MG \%} = \frac{m1-m2}{m0} \times 100$$

MG %: La teneur en matière grasse (g pour 100 g d'échantillon).

m0 : Le poids de la prise d'essai (g)

m1: Le poids du ballon vide (g).

m2 : Le poids du ballon avec l'extraite (g).

3.9. Dosage des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu)

Pour l'analyse des composés phénoliques de la gelée royale, on effectue le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode de Folin Ciocalteu.

3.9.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Slinkard et Singleton, 1977).

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

3.9.2. Mode opératoire

0,5g de la gelée royale est dilué dans 5 ml eau bidistillée. Ensuite dans une fiole jaugée de 20 ml: 0,5ml de la solution de la gelée royale est mélangé avec 2,5ml de réactifs de Folin-Ciocalteu à 0,2 N (Sigma -Aldrich, USA) pendant 5 min puis 2 ml de carbonate de sodium à 7,5% sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 760 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible.

Dans les mêmes conditions, un témoin est préparé avec de l'eau distillée à la place de la gelée royale. Une gamme étalon de l'acide gallique pour exprimer les résultats obtenus, on détermine la densité optique à 760 nm par rapport au témoin.

La teneur en polyphénol est déterminée par mesure de l'absorbance en spectrophotométrie à 760 nm en comparaison à une courbe étalon obtenue avec l'acide gallique dont la concentration varie entre 0,01-0,05 mg/ml d'acide gallique (voir annexe 3). Le contenu phénolique total est exprimé en équivalent d'acide gallique par μg d'acide gallique/1g de RJ (Nabas et al., 2014).

4. Etude des propriétés immunomodulatrices de la gelée royale

4.1. Animaux et condition d'élevage

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. Les souris vivent dans des cages conventionnelles, munies d'une mangeoire et d'un biberon. Elles ont libre accès à une nourriture standard.

4.2. Adjuvant

Nous avons utilisé de l'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$ 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. 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.

4.3. Répartition des animaux

5 groupes de souris comprenant chacun 20 femelles Balb/c âgées de 3 à 4 semaines et pesant en début de manipulation $16,56 \pm 0,5\text{g}$ sont utilisés.

- ✓ **1^{er} groupe (n=20)**: Constitué de souris recevant l'eau physiologique pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (témoin positif: T+).
- ✓ **2^{ème} groupe (n=20)**: Constitué de souris recevant la gelée royale à raison de 0,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg.

- ✓ **3^{ème} groupe (n=20):** Constitué de souris recevant la gelée royale à raison de 1g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg.
- ✓ **4^{ème} groupe (n=20):** Constitué de souris recevant la gelée royale à raison de 1,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg.
- ✓ **5^{ème} groupe (n=20):** Constitué de souris ne recevant aucun traitement (témoin négatif: T-).

4.4. Protocole d'immunisation

Les souris sont immunisées par voie intrapéritonéale avec 100 μ l de PBS pH 7,4 contenant 10 μ g de β -Lg + 2 mg Al (OH)₃.

Les injections intrapéritonéales ont lieu à J₀, puis sous forme de rappels et dans les mêmes conditions aux 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jours du protocole (Négaoui et al., 2009) (figure 8).

4.5. Prélèvement sanguin

Un prélèvement sanguin est effectué à l'aide d'une pipette pasteur à J₀, avant toute immunisation, à partir du sinus rétro orbitaire et le deuxième prélèvement s'effectue à J₃₅. Un volume de 200 μ l de sang par souris est prélevé et centrifugé à 3500 tours/min pendant 15 minutes à 4°C. Le sérum récupéré est ensuite congelé à -20° C jusqu'à utilisation.

4.6. Dosage des anticorps IgE totaux

4.6.1. Principe général de la méthode ELISA sandwich

Un dosage Elisa sandwich consiste à piéger les IgE totales de nos échantillons entre un anticorps de capture adsorbé sur une microplaque de 96 puits et un anticorps de détection. L'anticorps secondaire (de détection) est dans la plupart des cas biotinylé. Cette caractéristique lui permet de se fixer à un complexe enzymatique (une peroxydase telle la streptavidine-HRP). La révélation des résultats est effectuée à l'aide d'un substrat chromogène 3, 3', 5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB, BD OptEIA).

4.6.2. Mode opératoire

Le dosage des anticorps IgE totaux est réalisé par la technique ELISA sandwich à l'aide de plaques de 96 puits à fond plat (NUNC MaxiSorb), selon les étapes suivantes:

- Tous les puits de la microplaque reçoivent 100 μ l d'anticorps de capture (BD Pharmingen) dilués au 1/1000^{ème} dans du PBS 1/10 à PH 7,4. Agiter la plaque pour s'assurer que tous les puits

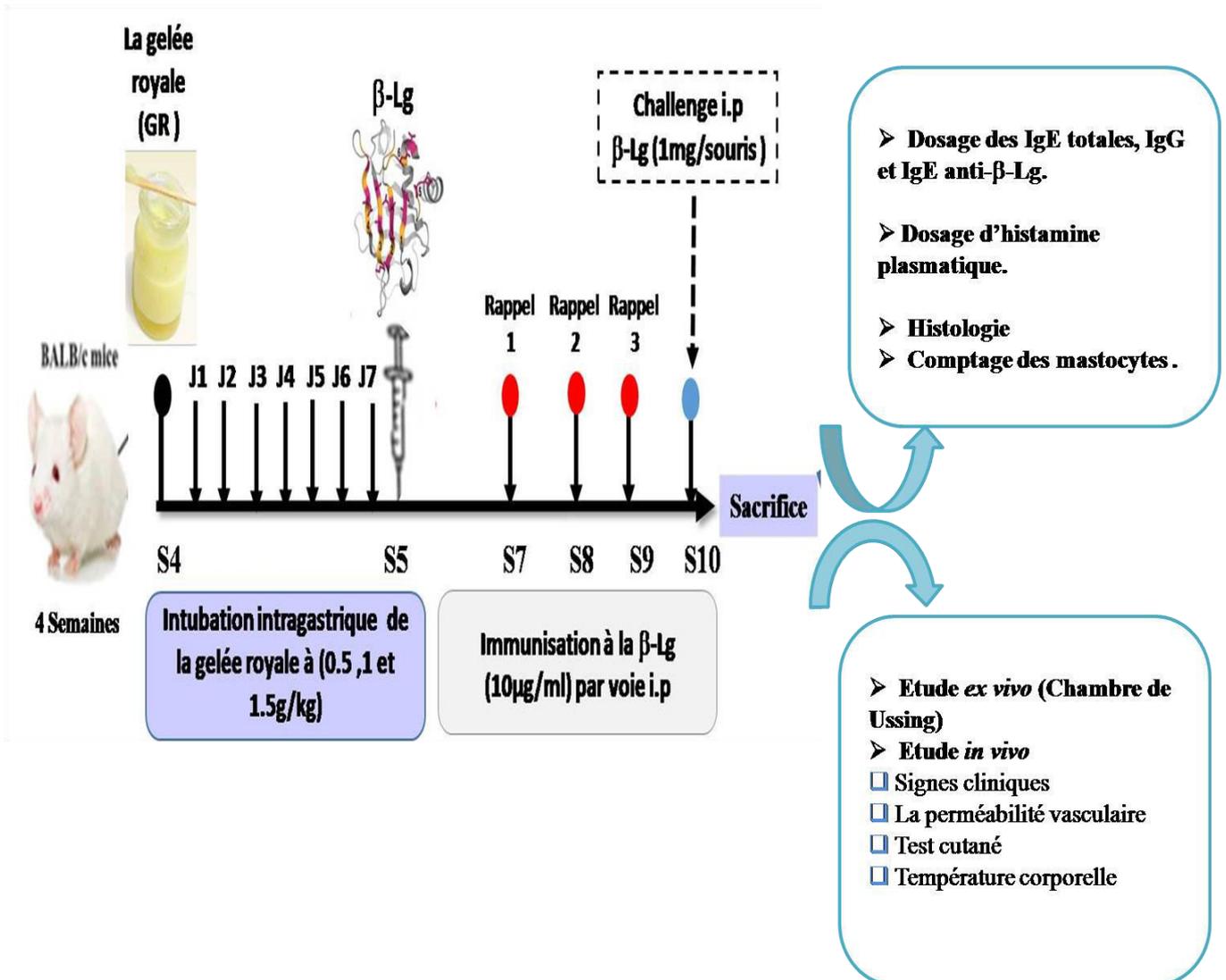


Figure 8. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

sont couverts par la solution d'anticorps de capture. Les plaques sont alors incubées pendant une nuit à + 4°C.

- L'excès d'anticorps 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 (El x 50).
- Les sites non spécifiques sont saturés par le dépôt, dans tous les puits, de 200 µl de SAB à 1% dans du PBS 1/10 pH 7,4.
- Couvrir la plaque et incuber à température ambiante pendant 30 minutes puis laver 3 fois de suite avec le tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- L'opération suivante consiste à diluer les échantillons de sérum à tester au 1/10^{ème} dans un tampon de saturation (SAB à 1%). Puis, un volume de 100 µl de ces dilutions est déposé dans des puits appropriés. La plaque est alors incubée toute la nuit à 4°C, puis lavée 3 fois de suite au tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- L'anticorps de détection, anti-IgE de souris (BD Pharmingen) dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon de saturation. Puis 100 µl sont déposés dans chaque puit. La plaque est alors incubée pendant 1 heure à température ambiante et est ensuite lavée 6 fois au tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- 100 µl de streptavidine de raifort (HRP) (Sigma) diluée à 1/1000^{ème} dans le tampon de saturation sont déposés dans tous les puits. La plaque est ensuite incubée pendant 30 minutes à température ambiante, suivie de 6 lavages successifs au tampon de lavage PBS/ Tween 20 0,05%.
- 100 µl d'une solution contenant un chromogène le TMB sont déposés dans chaque puits de la plaque.
- Une réaction colorée se développe en 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H₂SO₄ 2N permet de stopper la réaction.
- L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur (ELx800).

4.7. Dosage des anticorps IgG et IgE spécifique anti β-Lg

Afin d'évaluer l'effet de la gelée royale sur la réduction de la réponse sérique en anticorps spécifiques, nous avons dosé les anticorps sériques IgG et IgE anti β-Lg, selon un procédé non compétitif par la technique immunoenzymatique ELISA et dont le principe est le suivant:

4.7.1. Principe général de la méthode ELISA indirecte

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).

4.7.2. Mode opératoire

Le dosage ELISA des IgG et IgE spécifiques anti- β -LG est réalisé par la technique ELISA indirecte à l'aide de plaques de 96 puits a fond plat (NUNC MaxiSorb), selon les étapes suivantes:

- Tous les puits de la microplaque reçoivent 100 μ l de β -Lg à la concentration de 10 μ g/ml, dissoute dans du PBS pH 7,4 dilué au 1/10 (tableaux 9). 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 (El x 50).
- Les sites non spécifiques sont saturés par le dépôt, dans tous les puits, de 300 μ l de Polyvinyl alcohol (PVA) à 1% 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 avec le tampon de lavage PBS/Tween 20 0,05%.
- L'opération suivante consiste à diluer les échantillons de sérum à tester au 1/10^{ème} dans un tampon de dilution (PBS 0,1M/ PVA 0,33% Tween 20 0,1% pH 7,4). Pour cela, une série de dilution est alors effectuée allant de 10⁻¹ à 10⁻⁷. Puis, un volume de 100 μ l 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 dans du tampon de dilution. L'anti anticorps déposé est soit un anti IgG (Sigma) dilué au 1/20000^{ème} soit un anti IgE (BD Pharmingen) dilué au 1/5000^{ème}.

➤ La plaque est alors incubée pendant 1 heure 30 mn à 37°C, suivie de 3 lavages successives au tampon de lavage PBS/ Tween 20 0,05%.

➤ 100 µl d'extravidine peroxydase (Sigma) diluée à 1/5000^{ème} dans le tampon de dilution pH 7,4 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%, 200 µl d'une solution contenant un chromogène (l'orthophénylène diamine (OPD): 09 mg dilués dans 30 ml de tampon citrate de sodium 0,05M à pH 5,1 ainsi que 45 µl de H₂O₂) sont déposés dans chaque puits de la plaque. Une réaction colorée se développe en 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ajout de H₂SO₄ 2N permet de stopper la réaction (tableau 10).

➤ L'intensité de la réaction colorimétrique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur (ELx800).

➤ Des témoins positifs et négatifs ont été inclus dans chaque plaque afin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure.

4.8. Détermination des taux d'histamine plasmatiques

Le dosage de histamine est effectué en utilisant un KIT d'ELISA par compétition (A05890-96, SPI-BIO, Bertin Pharma, France). Cette technique est basée sur la compétition entre l'histamine des échantillons non marquée et l'histamine (traceur) liée à l'acétylcholinestérase (AChE) pour des sites d'anticorps anti-histamine spécifiques de souris fixés sur la plaque.

Afin de déterminer les taux d'histamine, le sang des différents lots obtenu 30 minutes après le test de provocation *in vivo* recueilli dans des tubes avec EDTA est centrifugé à 1600 g pendant 20 minutes. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à - 20°C jusqu'au dosage.

Le traceur, le standard ou l'échantillon sont incubés dans des puits qui sont préalablement recouverts avec un anticorps antihistaminique de souris.

La plaque est rincée pour éliminer tous les réactifs non liés et le réactif d'Ellman (substrat de l'acétylcholinestérase) est ajouté aux puits. L'activité enzymatique fixée sur la phase

Tableau 9. Composition de la solution mère du tampon phosphate salin PBS 1M, pH 7,4

Composants	Quantités
Na ₂ HPO ₄	11,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
Eau ultra pure	1000 ml

Tableau 10. Composition des solutions tampons utilisées dans la technique Elisa.

Tampon PBS 1M: à diluer au 1/10.
Tampon de lavage: PBS 0,1M pH 7,4 Tween 20 0,05%
Tampon de saturation: PBS 0,1 M pH 7,4 PVA 1%
Tampon de dilution: PBS 0,1 M pH 7,4 PVA 0,33 % Tween 20 0,1%
Solution de révélation: 09 mg d'Orthophénylène diamine (OPD) + 30 ml de tampon citrate de sodium 0,05M à pH 5,1 + 45 µl de H ₂ O ₂ (substrat de la peroxydase).

solide est alors révélée par la réaction colorimétrique d'Ellman. La mesure de l'absorbance est alors effectuée à une longueur d'onde de 405 nm à l'aide d'un lecteur (ELx800).

L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la quantité du traceur lié au puits et est inversement proportionnelle à la quantité d'histamine libre présente dans les puits pendant l'incubation immunologique. La concentration d'histamine dans les échantillons est obtenue par comparaison avec une courbe standard telle que décrite par le fabricant.

4.9. Tests de provocation

4.9.1. Signes cliniques: test de provocation *in vivo*

Ce test biologique permet de mesurer la capacité de la gelée royale à réduire les signes de manifestations allergiques provoquées par la sensibilisation à la β -Lg.

Dix souris de chaque groupe reçoivent par une injection unique, sans adjuvant, de 1 mg d'allergène (β -Lg) par voie intrapéritonéale (i.p). Les signes de manifestation allergique commencent à être observés 10 à 15 minutes après injection intrapéritonéale d'allergène sans adjuvant et l'intensité de la réaction est maximale entre 20 et 40 minutes (D'après Li et al., 1999a). La classification admise pour la mesure des manifestations cliniques est indiquée dans le tableau 11.

4.9.2. La perméabilité vasculaire

Pour évaluer la perméabilité vasculaire, 3 à 5 souris de chaque groupe reçoivent 100 μ l de colorant de bleu d'Evans à 0,5% (Sigma) par injection dans la veine de la queue juste avant l'injection intrapéritonéale d'allergène (β -Lg). Une couleur bleue présente dans la peau 30 min après l'injection a été considérée comme un test cutané positif (Li et al., 1999b).

4.9.3. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I

Le test cutané d'hypersensibilité de type I est utilisé afin de diagnostiquer une réaction allergique aux protéines de lait de vache. Ce test est effectué selon la méthode de Wiedermann et al. (1998) avec une légère modification.

Trois souris de chaque groupe reçoivent, 100 μ l de bleu d'Evans à 0,5% par voie intraveineuse au niveau de la queue des souris. Ensuite, 20 μ l de solution PBS contenant 2 μ g de β -Lg sont injectés par voie intradermique dans la peau abdominale rasée.

Le compound 48/80 responsable de la dégranulation des mastocytes (20 μ g, Sigma-Aldrich) a été injecté en tant que témoin positif et un tampon phosphate salin (PBS) comme témoin négatif.

Tableau 11. Classification admise pour mesurer les manifestations allergiques (Li et al., 1999a; Lifrani, 2005).

Stade	Signes
0	Pas de symptôme
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

Après 15-20 min, les souris ont été sacrifiées et le diamètre de la réaction de couleur a été mesuré à l'intérieur de la peau (figure 9).

4.9.4. Mesure de la température corporelle

Le but de cette étude est de vérifier si le challenge à la β -Lg par voie intrapéritonéale induit un choc anaphylactique qui s'accompagne à une baisse de la température corporelle chez les souris sensibilisées à la β -Lg.

La température corporelle est mesurée 30 minutes après la provocation intrapéritonéale avec l'allergène (β -Lg) en utilisant une sonde rectale.

4.9.5. Expérimentation sur l'intestin isolé en Chambre de Ussing: test de provocation *ex vivo*

Dans cette partie de travail, nous évaluons l'effet de la gelée royale sur la réponse anaphylactique locale induite par la β -Lg. Cette étude est menée grâce au dispositif de la chambre de Ussing (figure 10). Ce système permet de réaliser un test de provocation *ex vivo* par la mise en contact des épithéliums intestinaux de souris des différents groupes avec l'antigène sensibilisant (la β -Lg).

4.9.5.1. 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. Depuis, cette méthode a été appliquée à de nombreux modèles animaux de laboratoire et est utilisée pour des fragments d'intestin humain (Heyman et al., 1982; Kheroua, 1987; Marcon-Genty et al., 1989; Saidi et al., 1995).

Un fragment de muqueuse intestinale est monté à plat entre deux demi-chambres de Lucite dont l'ouverture, déterminant la surface, est adaptée à la taille du fragment à étudier ($0,2\text{cm}^2$). Les deux faces du tissu déterminent un compartiment muqueux (représentant la lumière intestinale) et un compartiment séreux (représentant la circulation sanguine) sont baignés par des solutions identiques (Ringer) maintenues à 37°C , brassées et oxygénées continuellement par un courant de carbogène (O_2 : 95%, CO_2 : 5%) maintenant le pH à 7,4.

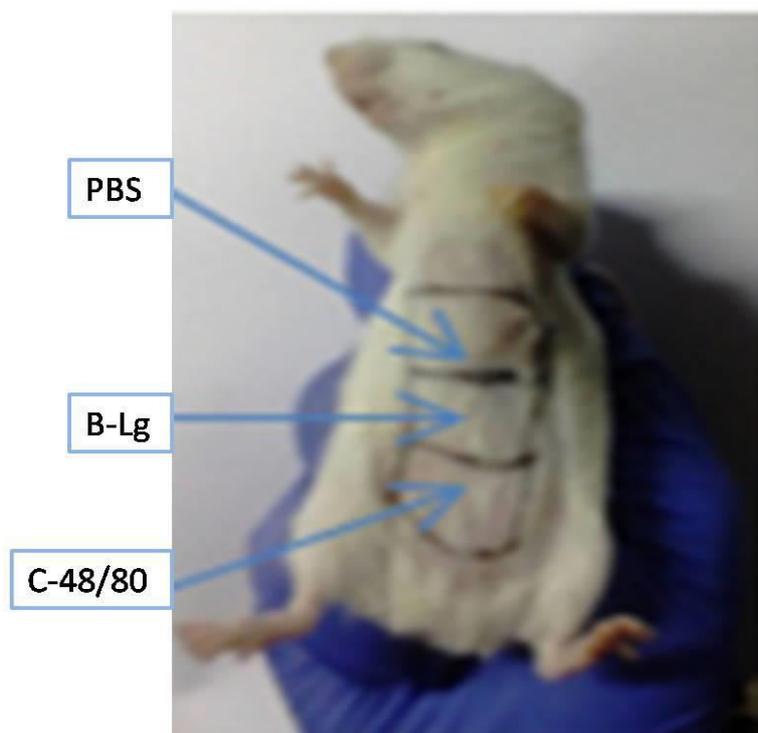
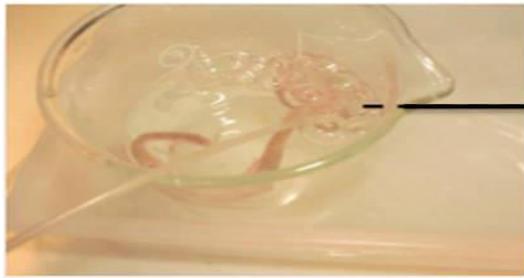


Figure 9. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I.



Prélèvement du jéjunum



La cassette

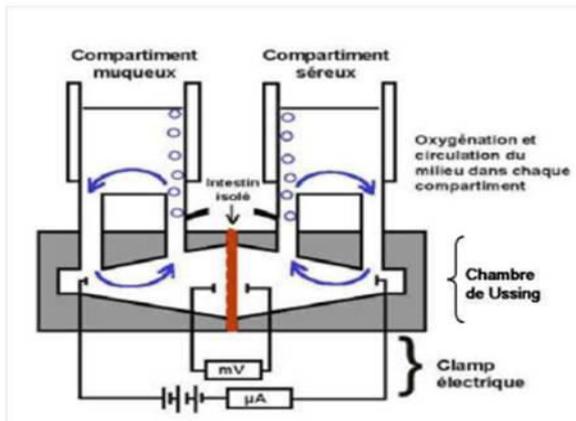
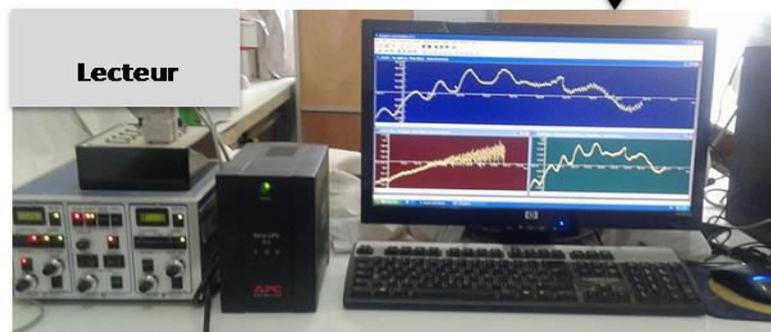


Schéma de montage d'une chambre d'Ussing



Dispositif de la chambre de Ussing



Transfert et traitement des résultats

Figure 10. Le dispositif de la chambre de Ussing.

Le principe même de la chambre de Ussing est qu'il ne doit exister aucun gradient électrochimique permettant à une solution donnée de traverser le tissu. Cette condition est remplie lorsque les deux faces du tissu sont baignées par des solutions ayant la même composition, la même température, le même pH et la même osmolarité.

La chambre de Ussing permet de vérifier l'état du tissu biologique par la mesure des paramètres électriques tels que le courant de court-circuit (I_{sc}), la différence de potentiel transépithéliale (DDP) ou encore la conductance membranaire (G).

Le courant de court-circuit (I_{sc}) représente la somme des flux nets ioniques, principalement de Na^+ et de Cl^- et un flux résiduel d'ions HCO_3^- .

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

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

4.9.5.2. 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 Pentothal à 50 mg/kg^{-1} . Après laparotomie, le segment jéjunal entier est prélevé délicatement de la cavité abdominale, vidé de son contenu par deux ou trois rinçages au Ringer froid (tableau 12). Après l'avoir délicatement débarrassé des mésentères, le segment jéjunal est ensuite incisé longitudinalement le long du bord anti-mésentérique puis découpé en fragments (10-20 cm) qui sont maintenus dans du Ringer froid et oxygénés par un courant de carbogène. A chaque fois, un fragment est monté entre deux chambres de Lucite. Le volume de Ringer déposé dans chaque compartiment de la chambre est de 5 ml, le système est maintenu à 37°C .

Les tissus sont «court-circuités» par un dispositif de tension automatique (modèle VCC MC8, Physiologic Instruments, San Diego, CA) et le courant de court-circuit (I_{sc} , mA/cm^2) est surveillé pendant un intervalle de temps, considéré comme un indicateur du transport net d'ions actif. Après montage du tissu environ 10 minutes sont nécessaires pour stabiliser les paramètres électrophysiologiques de base. Au terme de cette période, on dépose $60\mu\text{g/ml}$ de la β -Lg ou dans certains cas d'ovalbumine (OVA) comme contrôle antigénique non spécifique dans le compartiment séreux de la chambre. A la fin des expériences, la viabilité des tissus est évaluée par l'addition de 10 mM de glucose du côté muqueux.

Tableau 12. Composition de la solution de Ringer.

Na⁺	140 Mm	Cl⁻	120 Mm
K⁺	5,2 Mm	HCO₃⁻	25 Mm
Ca⁺⁺	1,2 Mm	HPO₄	2,4 Mm
Mg⁺⁺	1,2 Mm	H₂PO₄	0,4 Mm

Les différents paramètres électrophysiologiques sont mesurés chaque minute durant toute l'expérience à l'aide d'un logiciel (Acquire & Analyze 2.3).

4.10. Etude histologique

Cette étude a pour but de vérifier si l'administration de la gelée pendant 7 jours est capable de prévenir les modifications de la structure histologique de l'épithélium intestinal, particulièrement les modifications de l'architecture villositaire jéjunale induites par la sensibilisation à la β -Lg.

4.10.1. Traitement des échantillons

Les échantillons utilisés sont soumis préalablement à différents traitements qui sont:

4.10.1.1. Fixation

Les tissus sont fixés dans du formol à 10% tamponné. Les solutions de formaldéhyde sont les fixateurs les plus répandus.

4.10.1.2. Déshydratation

Après fixation, les tissus sont déshydratés dans 3 bains successifs d'acétone. Chaque bain dure 45 minutes.

4.10.1.3. Clarification

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

4.10.1.4. Inclusion

L'inclusion est effectuée avec de la paraffine, les échantillons sont placés dans deux bains successifs de paraffine pendant une heure chacun à une température de 56°C puis coulés dans des moules métalliques. Ensuite, des cassettes en plastique seront fixés dessus et le volume sera complété avec de la paraffine, puis mis au congélateur pendant 15 minutes pour une bonne solidification.

4.10.2. Traitement des lames

Après l'inclusion à la paraffine, les blocs contenant les fragments sont coupés à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 5 μ m.

4.10.2.1. Etalement sur lames

Une fois les coupes réalisées, elles sont mises sur une lame de verre recouverte de colle (2 g d'albumine + 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillé) puis placées sur une plaque chauffante réglée à une température convenable, inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. A l'aide d'une pince, les plis de la paraffine sont tirés légèrement de chaque côté, ensuite l'ensemble coupe-lame est retiré de la plaque, égoutté puis séché au papier Joseph. Avant de procéder à la coloration des lames, il faut les déparaffiner et les réhydrater.

4.10.2.2. Déparaffinage

Pour déparaffiner les lames, il suffit de les placer dans deux bains successifs de toluène. Chaque bain dure 10 minutes.

4.10.2.3. Réhydratation

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

4.10.2.4. Coloration

Les lames sont colorées à l'hémalum-éosine qui représente 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 hématéine de Harris est indiquée dans le (tableau 13) (Hould, 1984).

La coloration des lames s'effectue comme suit:

- Mettre les lames dans l' hématéine de Harris durant 2 à 3 minutes.
- Laver les lames à l'eau du robinet 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 100ml d'alcool éthylique) pendant 5 minutes.

- Rincer les lames dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 95°.
- Mettre les lames dans du toluène pendant 1 minute.
- Mettre entre les lames et lamelle une goutte de baume de Canada ou d'eukitt.
- Laisser sécher puis observer au microscope optique.

4.11. Mesure de la hauteur des villosités

Les mesures de la hauteur villositaire permettent de vérifier l'existence éventuelle d'une atrophie villositaire secondaire à l'immunisation intrapéritonéale des animaux.

4.11.1. Principe

Les mensurations des hauteurs villositaires sont effectuées sous un microscope optique muni d'un micromètre oculaire. Ces mesures s'effectuent après un étalonnage des divisions de l'échelle. Pour ce faire:

- Choisir l'objectif approprié pour l'observation et la mesure.
- Effectuer la mise au point sur l'objet à mesurer puis en déplaçant la lame à l'aide du chariot guide-objet.
- Orienter l'oculaire de sorte que le bord de l'objet à mesurer coïncide avec la graduation 0 UA et mesurer l'objet en UA.
- Convertir la taille mesurée en unités arbitraires (UA) en taille réelle (μm). Pour l'objectif (x10) chaque division correspond à 12,8 μm .

4.12. Comptage des mastocytes

Les mastocytes sont des cellules effectrices clés dans les réactions allergiques de type I ainsi que dans d'autres processus inflammatoires, certaines études telles que celle d'Ahrens et al. (2012) a montré l'existence d'une corrélation positive entre le nombre de mastocytes intestinaux et le développement de symptômes systémiques de l'anaphylaxie.

4.12.1. Mode opératoire

- De la fixation jusqu'au déparffinage ces échantillons sont traités de la même manière que ceux réservés à l'analyse histologique.
- La coloration des lames est effectuée comme suit selon le protocole décrit par Hould, (1984):
- Laver les lames à l'eau du robinet pendant 5 minutes.
- Immerger les coupes dans le tampon phosphate à 0,02mol/l pH 4 pendant une minute.
- Colorer les lames au bleu de toluidine à 0,1% pendant 3 minutes (tableau 14).

- Rincer quelques instants dans le tampon phosphate à 0,02mol/l pH 4.
- Mettre entre les lames et lamelle une goutte d'eukitt.
- Laisser sécher puis observer au microscope optique.

4.12.2. Expression des résultats

Pour le comptage des mastocytes nous utilisons la méthode préconisée par Huang et al. (2016). Le nombre de mastocytes totaux est compté manuellement dans six champs par tissu de chaque souris (n=6). Après la coloration au bleu de toluidine, les noyaux des mastocytes sont colorés en bleu et les granulations métachromiques du cytoplasme apparaissent en rouge pourpre ou violet.

4.13. 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. Les comparaisons de plusieurs moyennes sont réalisées par l'analyse de variance (ANOVA) avec le test post-hoc de Tukey utilisant le logiciel GraphPad Prism (version 5.01). Le seuil de signification retenu est celui qui est habituellement considéré, soit 5 %.

Tableau 13. Composition du colorant à l'hématéine de Harris (Hould, 1984).

Composants	Quantités
Hématoxyline	5g
Alun de potassium	100g
Ethanol absolu	50 ml
Eau distillée	1000 ml
Faire bouillir le mélange	
Oxyde mercurique	2,5g
Chauffer la solution et filtrer avant usage	

Tableau 14. Composition des solutions tampons utilisées dans le comptage des mastocytes (Hould, 1984).

Tampon phosphate 0,02 mol/L pH 4	
NaH₂PO₄	2,7598g
Eau distillée	1000 ml
Colorant	
Bleu de toluidine	0,1g
Tampon phosphate 0,02 mol/L pH 4	100 ml

Résultats

Rapport-Gratuit.com

1. Etudes physico-chimiques de la gelée royale

L'étude des propriétés physico-chimiques permet de caractériser les échantillons de gelée royale des deux régions (Blida et Boumerdès) utilisés dans le cadre de ce travail.

1.1. Le pH

Les valeurs du pH des gelées royales étudiées sont présentées dans la figure 11. Le pH de la gelée royale de la région de Blida est $3,78 \pm 0,02$ alors que celui de la région de Boumerdès est de $3,79 \pm 0,01$. Donc la gelée royale est acide.

1.2. L'acidité libre

Les valeurs de l'acidité libre des deux échantillons de la gelée royale sont présentées dans la figure 12. On note une acidité libre de l'ordre de $2,68 \pm 0,075 \text{ ml } 0,1 \text{ N NaOH/g}$ pour la gelée royale de la région de Blida et de $2,80 \pm 0,075 \text{ ml } 0,1 \text{ N NaOH/g}$ pour la région de Boumerdès, avec l'absence de toute différence significative entre les deux échantillons.

1.3. Teneur de l'eau

La teneur en eau est un des critères de qualité de la gelée royale (Hu et al., 2016). Les valeurs de la teneur en eau et des matières sèches des échantillons de la gelée royale étudiée sont présentées dans la figure 13. La teneur en eau est de $62,75 \pm 0,47$ pour gelée royale de la région de Blida et de $66,01 \pm 0,11$ pour celle de Boumerdès. Ces résultats montrent une différence significative ($p < 0,01$) entre la gelée royale de Blida et celle de Boumerdès qui a une teneur en eau plus importante. Par conséquent, une teneur en matière sèche est plus faible.

1.4. La cendre

Le taux des cendres nous renseigne sur la teneur totale en sels minéraux présents des échantillons de gelée royale étudiés. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 13.

La teneur en cendre de la gelée royale de la région de Blida présente une moyenne de $1,59 \pm 0,19$ et $1,75 \pm 0,24$ pour celle de la région de Boumerdès. On note l'absence de toute différence significative entre les deux échantillons.

1.5. Teneur totale en protéines dans la gelée royale.

Comme le montre la figure 14, aucune différence significative n'a été enregistrée dans les teneurs protéiques des deux échantillons (Blida et Boumerdès) avec des valeurs qui varient de 14,04-14,81% quelque soit la méthode utilisée (Kjeldahl et Lowry) pour son appréciation.

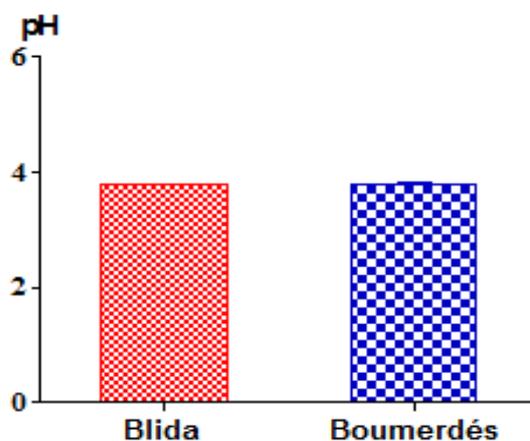


Figure 11. pH de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards($X \pm ES$)(n=6).

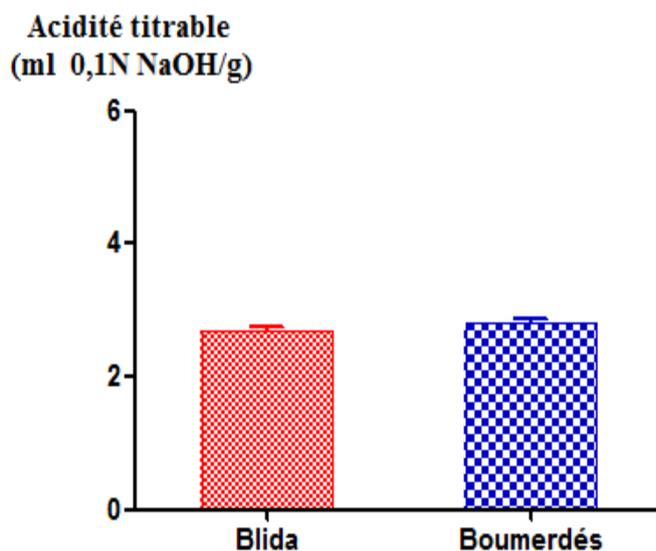


Figure 12. Acidité de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards($X \pm ES$)(n=6).

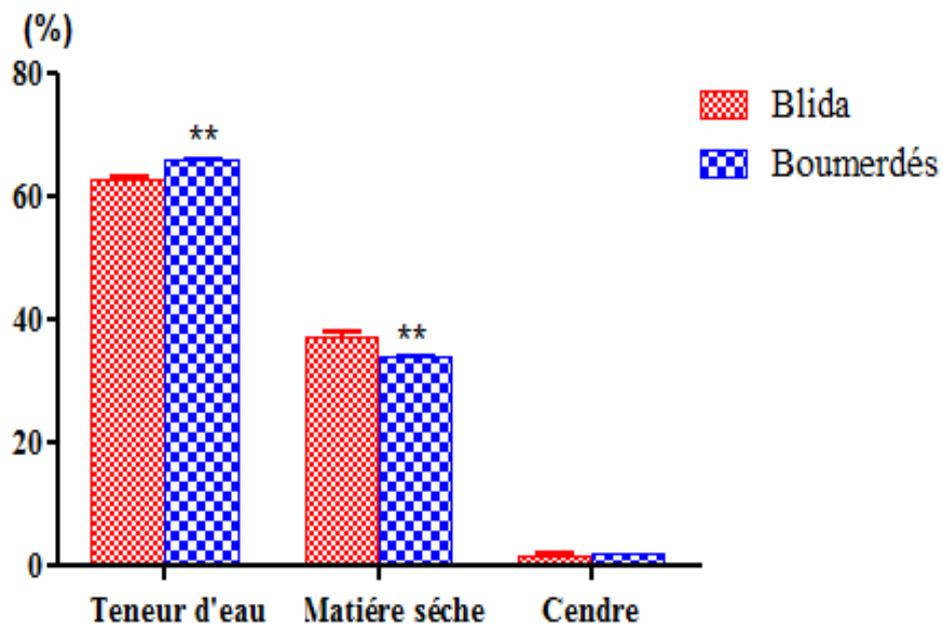


Figure 13. Teneur en eau, en matières sèches et en cendres brutes de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards($X \pm ES$)(n=6).

**** p<0,01**

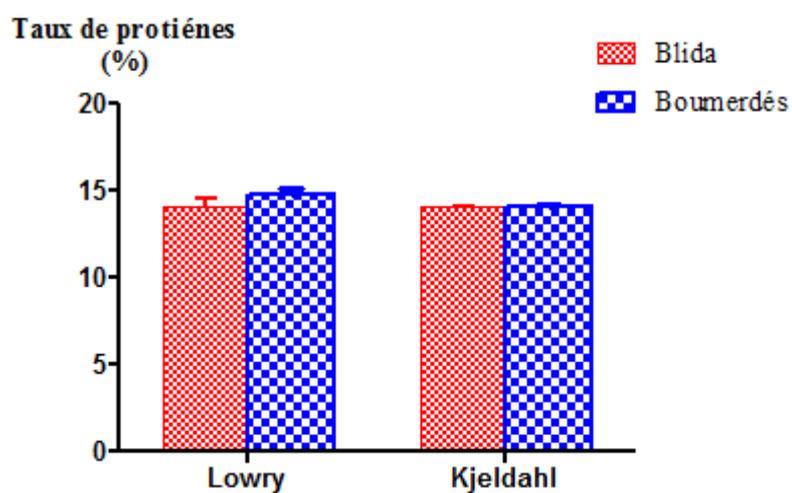


Figure 14. Teneur en protéines de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès) mesurée par deux méthodes différentes (Lowry et Kjeldahl).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards($X \pm ES$) ($n=6$).

1.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Cette technique permet d'identifier les protéines brutes présentes de la gelée royale. L'électrogramme des protéines de la gelée royale est illustré dans la figure 15. Le premier puits correspond à un kit marqueur constitué d'un mélange de protéines pures, de référence (Sigma et Merck, France), contenant de la lactoferrine (Lf) (80 000 Da), la sérum albumine bovine (SAB) (68 000 Da), Ovalbumine (45 000 Da), les Caséines (19-25 000 Da), la β -Lactoglobuline (β -Lg) (18 000 Da) et de l' α -Lactalbumine (α -La) (14 000 Da).

Le deuxième et le troisième puits du gel contiennent respectivement la gelée royale de la région de Blida et celle de Boumerdès, dans des conditions dénaturantes sans le β -mercaptoéthanol. On note clairement l'existence de 3 bandes protéiques de masse moléculaires situées entre 45 et 80 KDa. Ces bandes correspondent aux protéines majeures de la gelée royale: MRJP2, MRJP3 et MRJP5 correspondant respectivement au poids moléculaires de 49, 68 et 80 KDa.

Les puits 6 et 7 révèlent l'existence de 2 bandes protéiques de masse moléculaires situées entre 45 et 68 KDa. Ces bandes correspondent aux protéines majeures de la gelée royale: MRJP 2 et MRJP3.

1.6. Teneur en glucides totaux

La teneur en glucides totaux des échantillons de la gelée royale a été déterminée par la méthode de Bertrand. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16.

Les teneurs en glucides totaux varient de 8,88 à 8,90 % pour la gelée royale des deux régions (Blida et Boumerdès), avec l'absence de différence significative entre les deux échantillons.

1.7. Teneur en lipides

Les lipides sont les composés les plus importants pour déterminer l'authenticité ou l'adultération de la gelée royale, car plusieurs d'entre eux ne se trouvent dans aucun autre produit naturel. Les résultats analytiques du taux des lipides des échantillons de gelée royale sont présentés dans la figure 17.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en lipides des échantillons étudiés est de $3,68 \pm 0,01$ % de la région de Blida et $3,70 \pm 0,01$ % pour celle de Boumerdès.

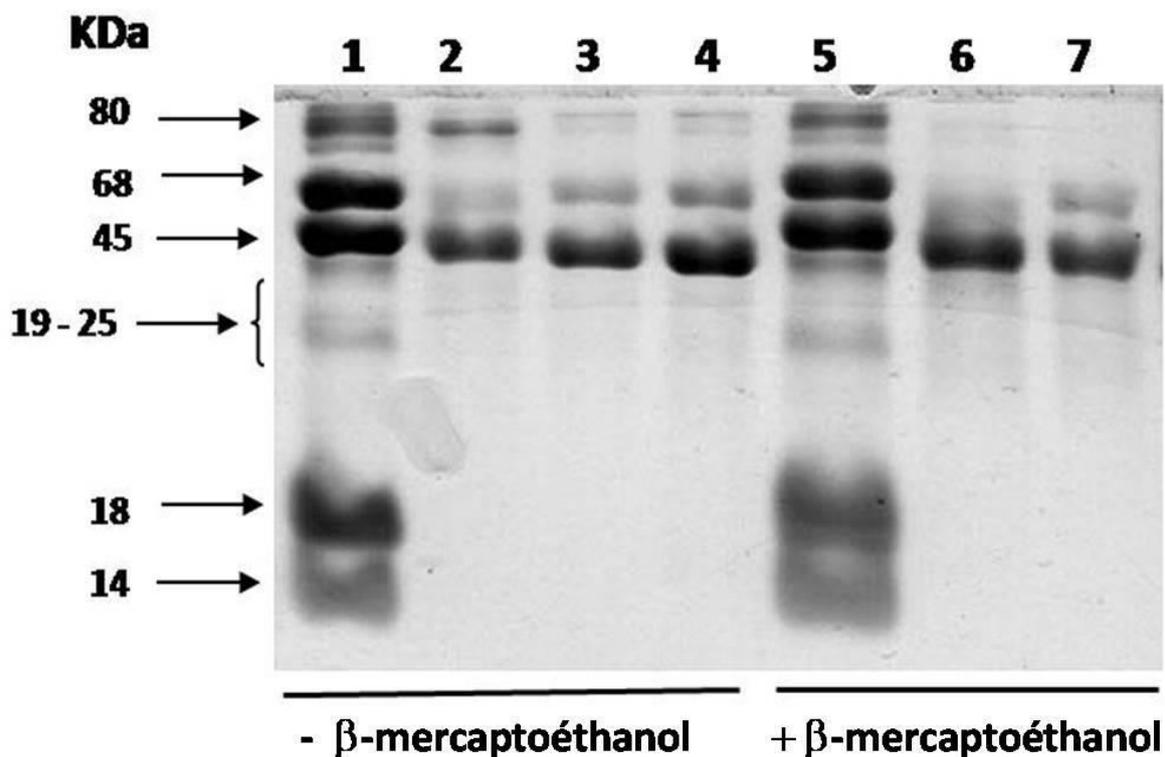


Figure 15. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) des protéines brutes de la gelée royale dans les conditions dénaturantes $-\beta$ -mercaptoéthanol et les conditions dénaturantes $+\beta$ -mercaptoéthanol.

1. Protéines de référence contenant: Lf (80 000 Da), La SAB (68 000 Da), Ovalbumine (45 000 Da), Cas (19 à 25 000 Da), β -Lg (18 000 Da), α -La (14 000 Da) dans les conditions dénaturantes $-\beta$ -mercaptoéthanol.

2. La gelée royale de la région de Blida.

3 et 4. La gelée royale de la région de Boumerdès.

5. Protéines de référence dans les conditions dénaturantes $+\beta$ -mercaptoéthanol.

6. La gelée royale de la région de Blida.

7. La gelée royale de la région de Boumerdès.

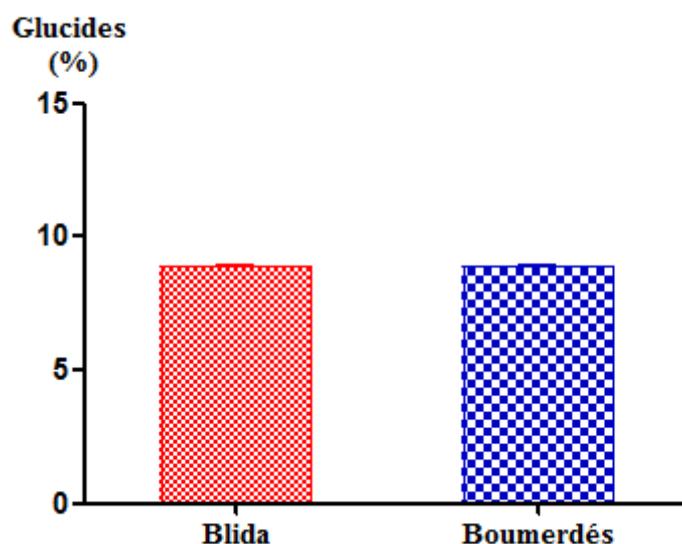


Figure 16. Teneur en glucides de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards ($X \pm ES$) ($n=6$).

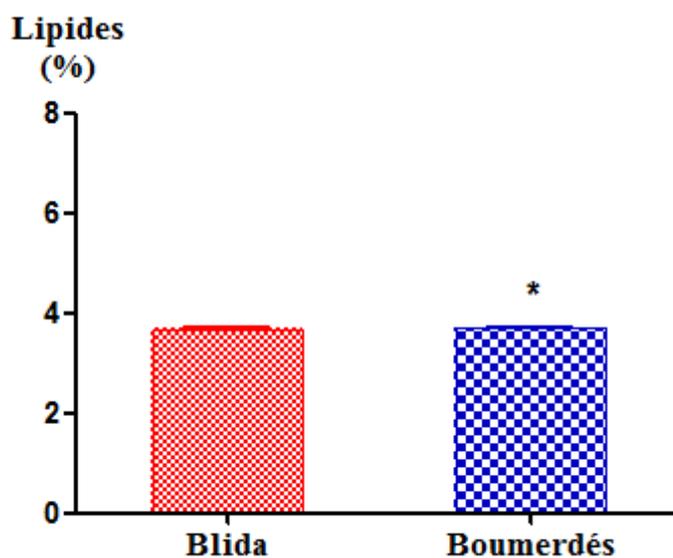


Figure 17. Teneur en lipide de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards ($X \pm ES$) ($n=6$).

*** $p < 0,05$.**

La comparaison de ces valeurs montre une différence significative ($p < 0,05$) entre la gelée royale de Blida et celle de Boumerdès.

1.8. Teneurs en polyphénols totaux de la gelée royale

La teneur en polyphénols totaux des échantillons de gelée royale a été déterminée par la méthode de folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols exprimées en μg d'équivalent d'acide gallique par 1g de la gelée royale sont présentées dans la figure 18.

Les résultats obtenus montrent que la gelée royale de Blida a une teneur en polyphénols de $157,16 \pm 11,07 \mu\text{g}$ d'EAG/g et $143,86 \pm 3,07 \mu\text{g}$ d'EAG/g pour celle de Boumerdès.

Pour récapituler, l'ensemble des paramètres chimiques de la gelée royale algérienne est présenté dans la figure 19.

2. Etude des propriétés immunomodulatrices de la gelée royale

2.1. Mesure des titres d'IgE totale, IgG et IgE spécifique anti β -Lg: Efficacité de la gelée royale.

L'objectif de cette partie du travail consiste à déterminer l'effet de l'administration de la gelée royale per os sur la réponse immune systémique de souris immunisées à la β -Lg. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons dosé les anticorps sériques de type IgE totales, IgG et IgE spécifiques anti β -Lg par la méthode immunoenzymatique ELISA.

2.1.1. Effet de la gelée royale sur le taux en IgE totale

Les résultats obtenus montrent les IgE totales sont produits de façon significative ($p < 0,01$) chez le groupe contrôle positif alors qu'ils sont absents chez le contrôle négatif. Les taux en IgE totales anti β -Lg sont plus bas chez tous les groupes ayant reçu la gelée royale à différents doses comparés au contrôle positif (figure 20).

2.1.2. Effet de la gelée royale sur le taux en IgG sérique anti β -Lg

A la fin de l'expérimentation, les anticorps sériques de type IgG anti- β -Lg sont produits de façon hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe contrôle positif (1/1260100ème) alors qu'ils sont absents chez le contrôle négatif. Par ailleurs et comparés au contrôle positif, la production des IgG anti- β -Lg est nettement plus faible ($p < 0,001$) chez les souris sensibilisées à la β -Lg et préalablement traitées à la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours (figure 21).

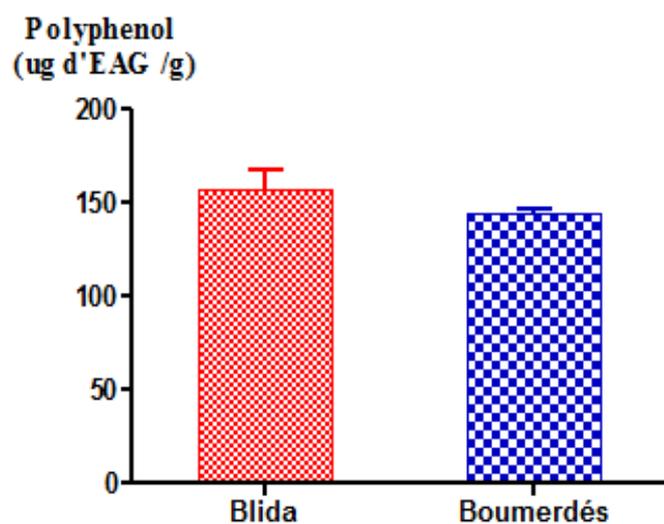


Figure 18. Teneurs en polyphénols totaux de la gelée royale des deux régions algériennes (Blida et Boumerdès).

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standards ($X \pm ES$) (n=6).

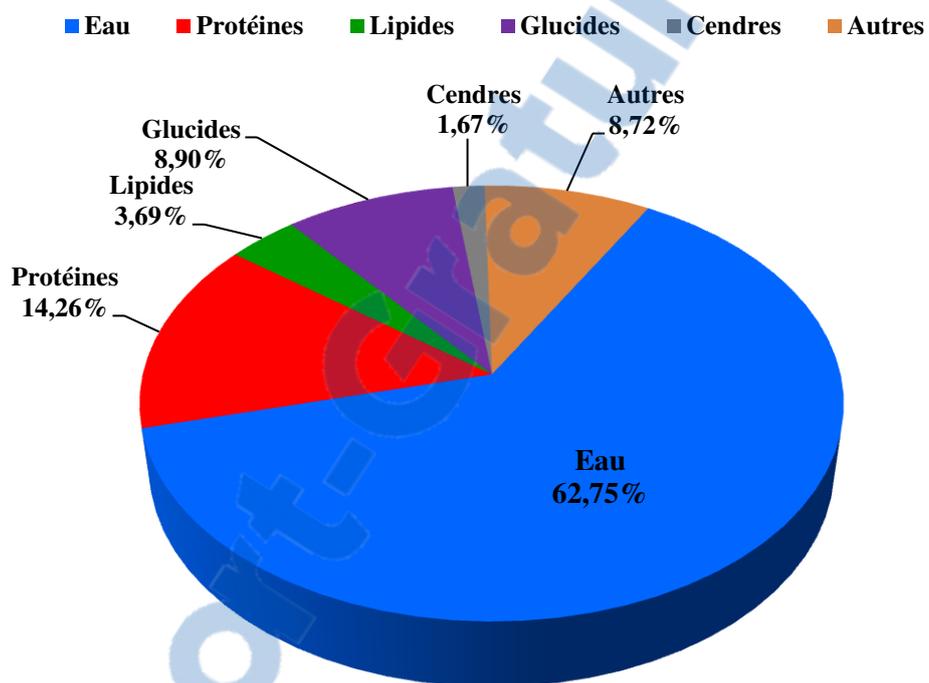


Figure 19. La composition chimique de la gelée royale

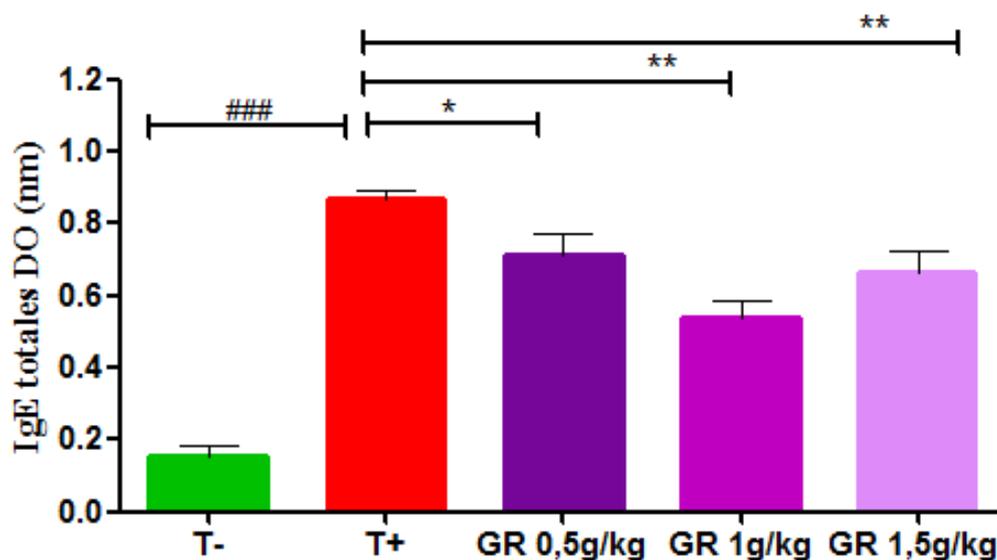


Figure 20. Absorbance des anticorps sériques spécifiques de type IgE totale mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

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

T-: Groupe de souris non sensibilisés (Témoin négatif).

T+: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg.

GR 1,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

* $p < 0,05$: GR 0,5g/kg vs T+

** $p < 0,01$: GR 1 g/kg et GR 1,5 g/kg vs T+

$p < 0,001$: T+ vs T-

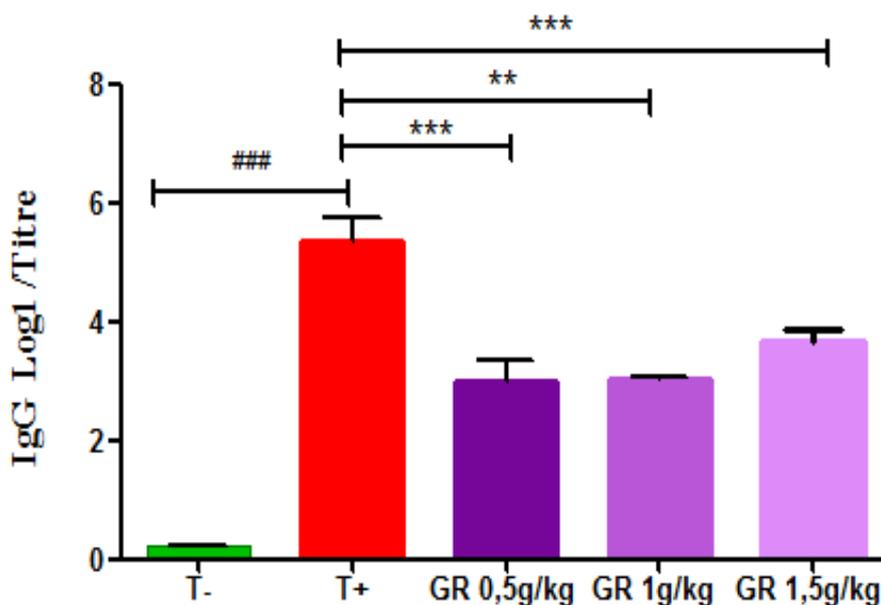


Figure 21. Titres sériques des IgG anti β -Lg mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

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

T-: Groupe de souris non sensibilisés (Témoin négatif).

T+: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg

GR 1,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

**** p<0,01:** GR 1g/kg vs T+

***** p<0,001:** GR 0,5 g/kg et GR 1,5 g/kg vs T+

p<0,001: T+ vs T-

2.1.3. Effet de la gelée royale sur le taux en IgE sérique anti β -Lg

Nos résultats montrent une production significativement élevée d'IgE anti- β -Lg ($p < 0,001$) chez les souris du témoin positif. Ce type de réponse IgE suggère à priori une réponse réaginique IgE dépendant. Cependant, cette production est significativement inférieure de façon à celle enregistrée chez les souris prétraitées avec la gelée royale à différentes doses (figure 22).

2.2. Taux d'histamine plasmatiques

Afin d'évaluer l'intensité de la réponse allergique des souris à la β -Lg, les taux d'histamine plasmatiques ont été mesurés après un test provocation intrapéritonéale à la β -Lg. Le dosage a été mesuré par kit immuno-enzymatique (EIA). Les résultats indiquent que l'administration de la gelée royale per os à différentes doses pendant 7 jours entraîne une diminution significative ($p < 0,001$) des taux d'histamine libérée suite à l'immunisation (figure 23).

2.3. Test de provocation in vitro: Evaluation des signes cliniques.

Il est toutefois important de rappeler que la production des anticorps de type IgE traduit une sensibilisation et non pas une réaction allergique. La réaction allergique doit être examinée par des tests de provocation. Dans le cadre de notre travail, les tests de provocation ont été effectués à J35 par voie intrapéritonéale avec une dose de 1 mg d'antigène (β -Lg) par souris.

Les résultats obtenus montrent que les souris de groupe témoin positif (T+) présentent des signes cliniques accentués allant jusqu'au stade 4. Ces signes cliniques représentent essentiellement une diminution de l'activité physique et des difficultés respiratoires. Mais aucun décès n'a été signalé. A l'inverse, les souris sensibilisées à la β -Lg et préalablement traitées à la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours ne présentaient aucun signe clinique. De plus, aucune manifestation clinique n'a été observée chez les souris du groupe témoin négatif (figure 24).

2.4. La perméabilité vasculaire

La libération d'histamine entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire qui est considérée comme un signe d'anaphylaxie.

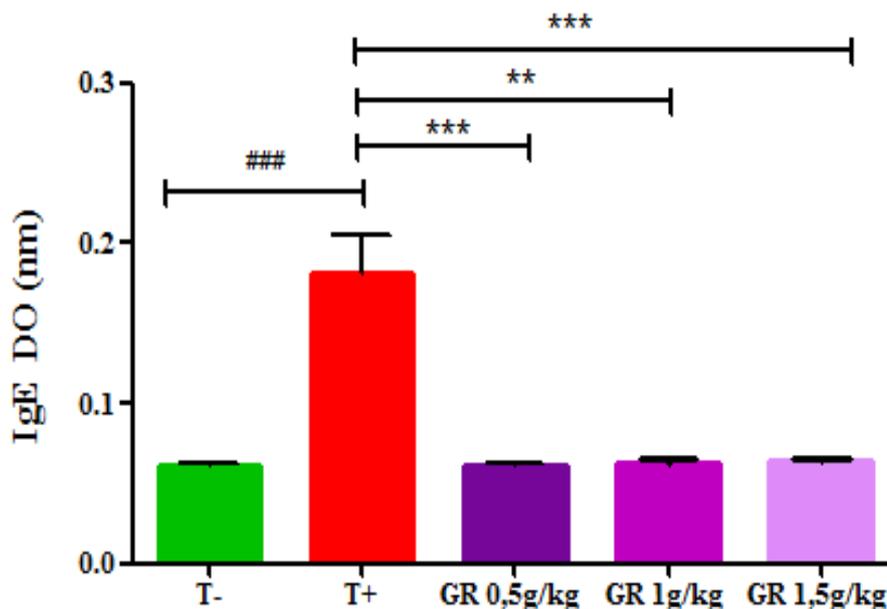


Figure 22. Absorbance des anticorps sériques spécifiques de type IgE anti β -Lg mesurés par ELISA chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

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

T-: Groupe de souris non sensibilisées (Témoin négatif).

T+: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg.

GR 1,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

**** p<0,01:**GR 1g/kg vs T+

***** p<0,001:**GR 0,5g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

p<0,001:T+vs T-

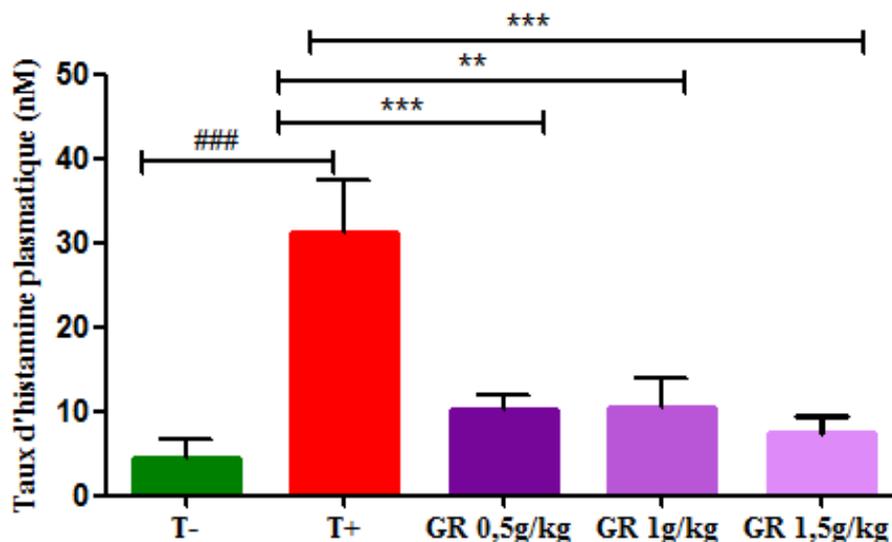


Figure 23. Taux d'histamine plasmatique libérée suite au test de provocation chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline(T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

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

T-: Groupe de souris non sensibilisées (Témoin négatif).

T+: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg

GR 1,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

****** $p < 0,01$: GR 1g/kg vs T+ ******* $p < 0,001$: GR 0,5g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

$p < 0,001$: T+ vs T-

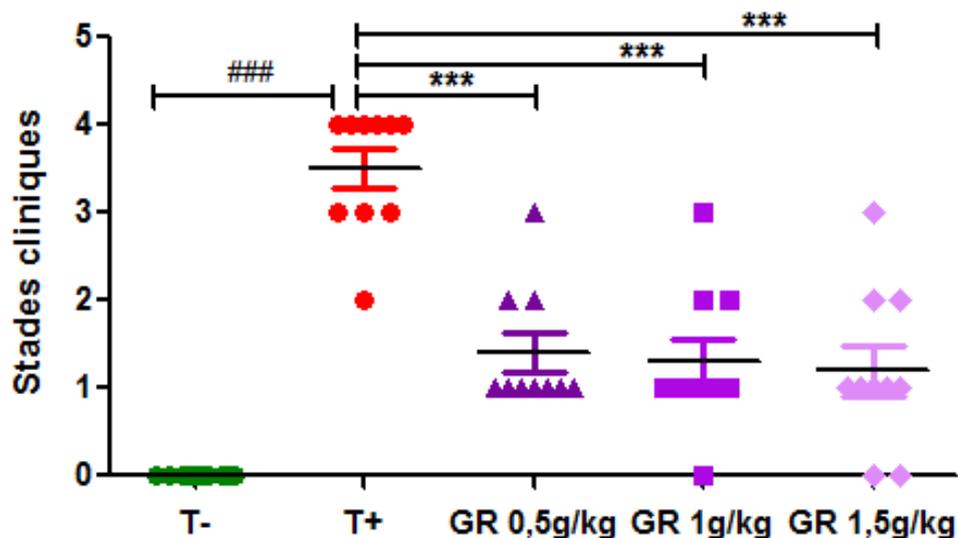


Figure 24. Stades de manifestations cliniques observées chez les souris suite aux tests de provocation réalisés avec l’allergène (β -Lg) par voie intrapéritonéale.

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

T-: Groupe de souris non sensibilisées (Témoin négatif).

T+: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg

GR 1,5g/kg: Groupe de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

******* $p < 0,001$: GR 0,5g/kg, GR 1g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

$p < 0,001$: T+ vs T-

Comme l'illustrent la figure 25, les coussinets plantaires, les yeux et la bouche des souris immunisées à la β -Lg (témoin positif) présentent une coloration bleue en conséquence d'une fuite vasculaire étendue. En revanche, les animaux immunisés et préalablement traités à la gelée royale ne présentaient aucun changement de couleur au niveau des coussinets plantaires, des yeux ou la bouche.

2.5. Température corporelle

Il est admis qu'un choc anaphylactique induit par un test de provocation s'accompagne le plus souvent d'une chute de la température corporelle. Pour cela, nous avons voulu vérifier une éventuelle chute de la température corporelle des souris suite à un challenge à β -Lg par voie péritonéale.

Nos résultats montrent une baisse rapide de la température corporelle chez les souris de groupe témoin positif (T+) qui a atteint son minimum 30 min après le test provocation. En revanche, aucune baisse de la température corporelle n'a été enregistrée chez les souris sensibilisées à la β -Lg et prétraitées à GR à différentes doses (0,5, 1 et 1,5 g/kg) (figure 26).

2.6. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I

Le test cutané est un test très courant pour la détection précoce des réactions allergiques. Il repose sur la mise en contact des mastocytes de l'épiderme avec un allergène donné. Les résultats obtenus montrent la formation d'une tache bleue d'un diamètre d'environ 11,5 mm chez les souris immunisées à la β -Lg (témoin positif), le seul groupe chez qui le test cutané est positif (figure 27).

2.7. Etude *ex vivo* en chambre de Ussing: test de provocation locale

L'objectif de cette partie de travail est de vérifier l'existence d'une éventuelle réponse anaphylactique locale après stimulation de la muqueuse jéjunale de souris immunisées à la β -Lg *ex vivo*, en chambre de Ussing.

Pour rappel, le dispositif de la chambre de Ussing permet de mesurer le courant de court circuit (I_{sc} , $\mu A/cm^2$) qui est un index de la sécrétion électrogénique de Cl^- , la différence de Potentiel (DDP, mv) entre les deux faces du tissu et la résistance du tissu (R, ohm/cm^2) ou son inverse, la conductance (G, $mmho/cm^2$) qui exprime un index de l'intégrité épithéliale, en particulier au niveau des jonctions cellulaires. Dans toutes nos expériences, chaque tissu est



Figure 25. Test de la perméabilité vasculaire au bleu d'Evans chez des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

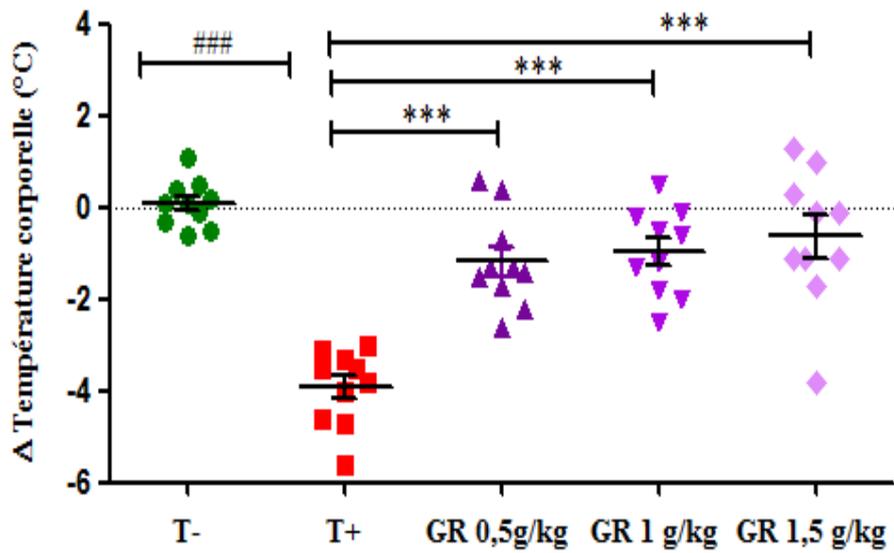


Figure 26. Température corporelle des souris enregistrée après le test de provocation à la β -Lg.

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

******* $p < 0,001$: GR 0,5g/kg, GR 1g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

$p < 0,001$: T+ vs T-

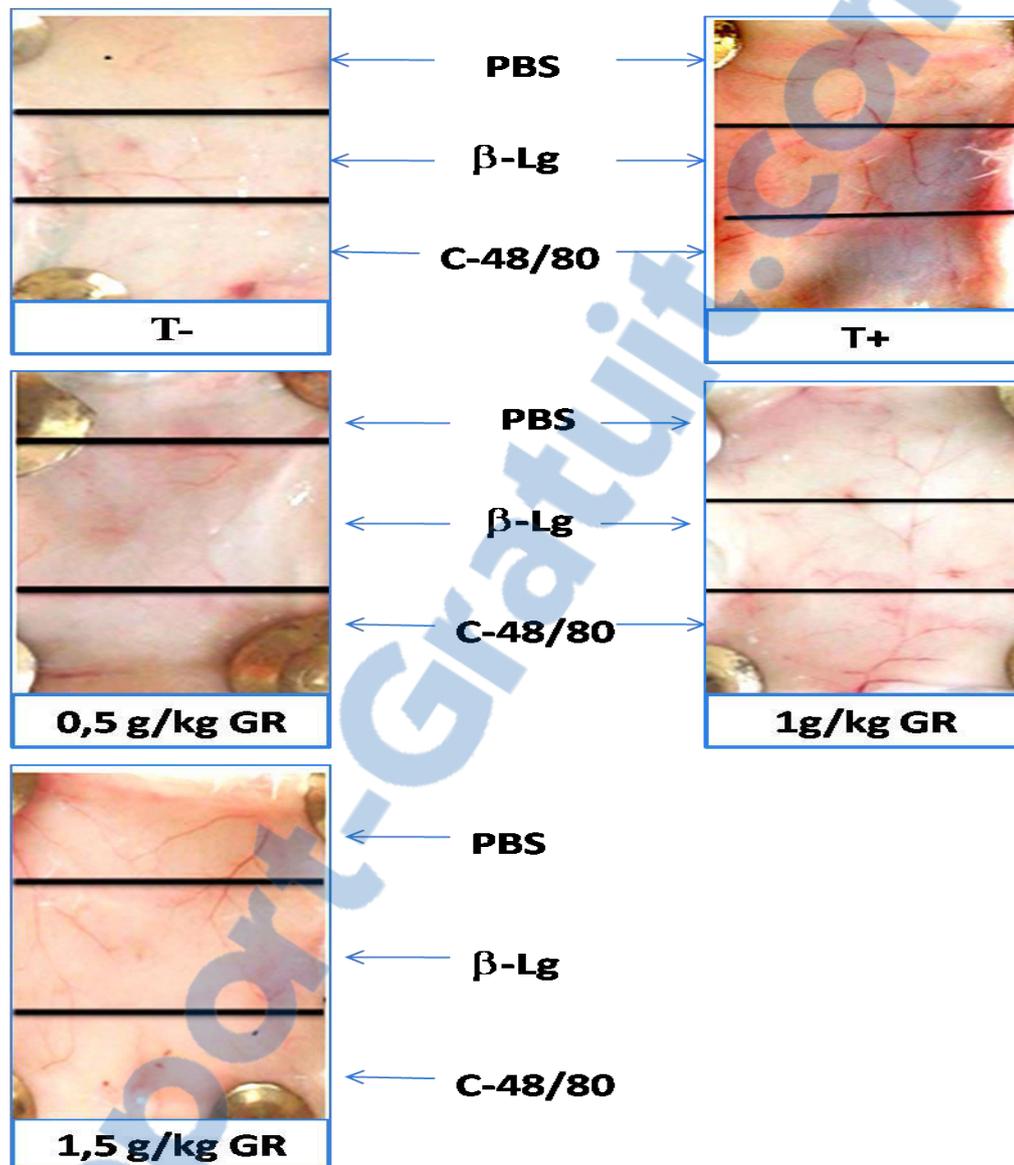


Figure 27. Test cutané de réaction d'hypersensibilité de type I chez des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

son propre témoin. Pour chaque paramètre étudié, les valeurs sont recueillies à l'état basal, c'est-à-dire avant toute stimulation, puis après dépôt de l'antigène sensibilisant (β -Lg) dans le compartiment séreux, pendant 10 minutes.

2.7.1. Mesure de la réaction anaphylactique locale (l'Isc)

2.7.1.1. Effet de la sensibilisation à la β -Lg: Témoins positifs

Lorsque les fragments jéjunaux des souris du groupe témoin positif (T+) sont montés en chambre de Ussing puis stimulés avec 60 μ g/ml de la protéine sensibilisante (β -Lg) déposée dans le compartiment séreux, on enregistre une augmentation très significative ($p < 0,001$) de l'Isc avec un écart (Δ) de l'ordre de $16,60 \pm 1,13 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (tableau 15a). Les valeurs de base de l'Isc passent de $38,17 \pm 3,21 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $54,78 \pm 3,55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (figure 28).

L'augmentation de l'Isc est obtenue dès la première minute après dépôt de la β -Lg et atteint son maximum entre la deuxième et la troisième minute. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une réaction anaphylactique locale produite par l'interaction directe de la β -Lg avec des effecteurs du système immunitaire associé à l'épithélium intestinal.

2.7.1.2. Effet de l'ovalbumine sur l'Isc: spécificité de la réponse anaphylactique à la β -lg

Dans les mêmes conditions d'expérience et afin de vérifier si l'augmentation de l'Isc des fragments de souris sensibilisées est spécifique à la β -Lg, l'ovalbumine a été déposée dans le compartiment séreux (60 μ g/ml). Le dépôt de l'ovalbumine dans le compartiment séreux ne se traduit par aucun effet significatif sur l'évolution de l'Isc (figure 29).

2.7.1.3. Effet du furosémide

Nos résultats précédents montrent clairement que l'Isc est significativement modifiée lorsque les épithéliums des souris immunisées sont exposés à la β -Lg (Témoins positifs). On considère que l'Isc est une mesure des mouvements ioniques à travers l'épithélium intestinal et sa modification traduit un changement dans le transport des électrolytes, principalement le Cl^- et le Na^+ .

Afin de déterminer la nature des mécanismes mis en jeu dans l'augmentation de l'activité sécrétoire de l'épithélium intestinal en présence d'un antigène sensibilisant, un diurétique, le furosémide a été utilisé. Cet agent inhibiteur spécifique du système cotransport $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$ localisé sur la membrane basolatérale. Le furosémide entraîne une déplétion de la cellule en Cl^- et donc une diminution de la sécrétion du Cl^- . Après montage des fragments jéjunaux des

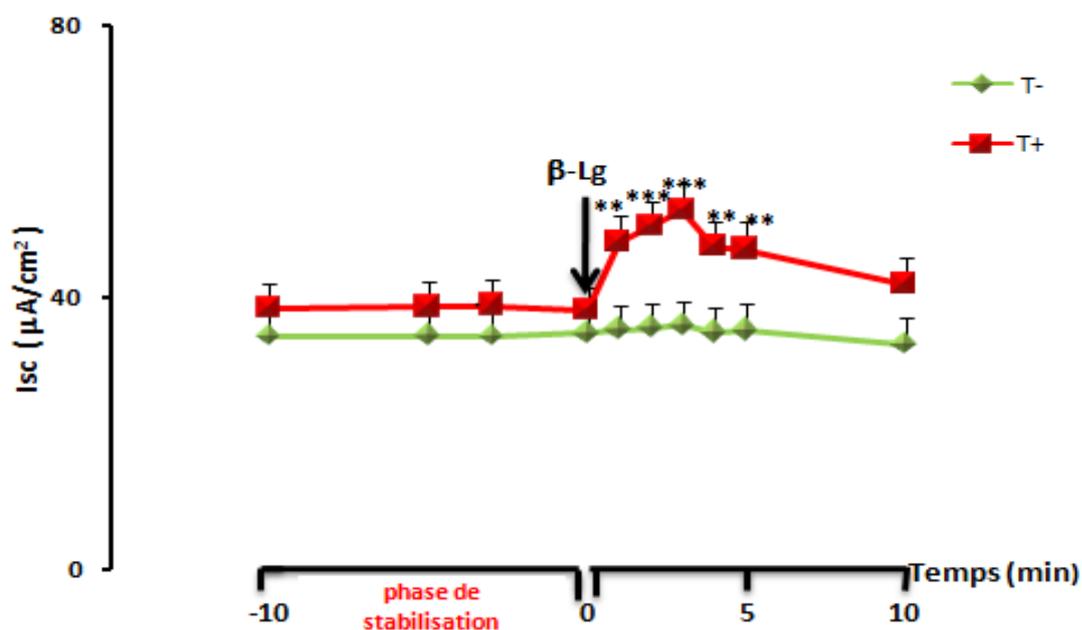


Figure 28. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court-circuit (Isc) des fragments jéjunaux des souris sensibilisées à la β -Lg, mesuré en chambre de Ussing.

Avant stimulation les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 10 minutes.

A $t = 0$, l'antigène sensibilisant (β -Lg) est déposé dans le versant séreux.

T- : Tissus de souris non sensibilisées (Témoin négatif).

T+ : Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

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

Chaque tissu est son propre témoin, les valeurs de l'Isc sont comparées à celle obtenue à T0.

**** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$**

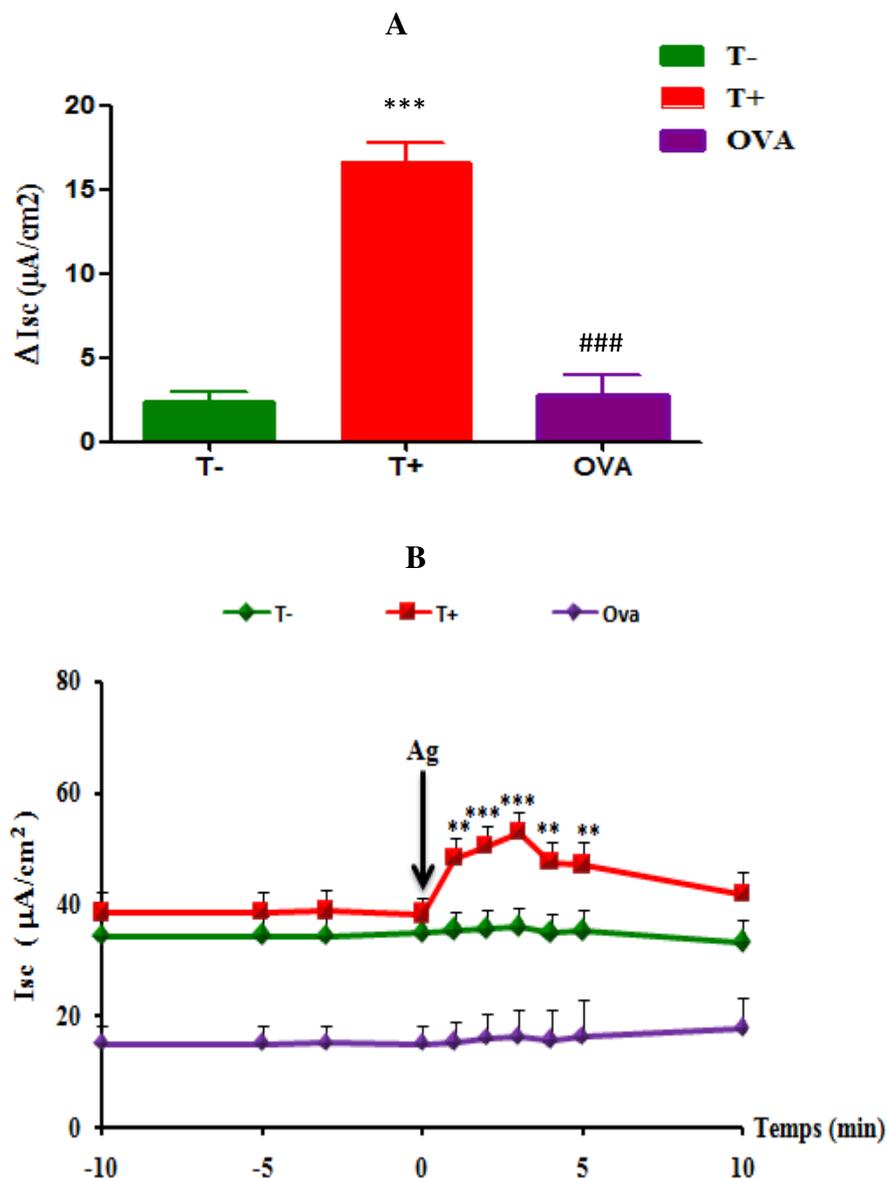


Figure 29. Effet spécifique de la β -Lg sur la différence de courant de court circuit (Isc) (A) et son évolution au cours du temps (B) en réponse à la stimulation à la β -Lg ou à l'ovalbumine mesurée en chambre de Ussing (n=6).

Le dépôt de l'ovalbumine est sans effet significatif sur l'Isc des tissus des souris immunisées. Les valeurs reportées sont des moyennes et leur erreur standard.

T-: Tissus d'animaux naïfs stimulés à la β -Lg.

T+: Tissus d'animaux sensibilisés et stimulés à la β -Lg.

OVA: Tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg et stimulés à l'ovalbumine.

Ag: Antigène (la β -Lg ou l'OVA).

****p<0,01 ***p<0,001**

souris en chambre de Ussing et stabilisation des paramètres électrophysiologiques.

Le furosémide est déposé du côté séreux à une concentration finale de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Ensuite ces mêmes tissus sont stimulés avec l'antigène sensibilisant.

Les résultats montrent que lorsque le furosémide est ajouté dans le compartiment séreux, l'Isc subit une diminution significative ($p < 0,05$) au cours de temps. Comme l'attestent les valeurs passent de $73,47 \pm 3,07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ à $56,22 \pm 6,39 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (figure 30).

Ces résultats montrent que le furosémide agit sur la membrane basolatérale en inhibent le cotransport Cl/Na/K. Cette action entraîne une diminution de la sécrétion de Cl^- et se traduit par une augmentation de l'Isc. Cela implique que dans nos conditions expérimentales, le courant de court-circuit induit par l'antigène est un courant de chlore.

2.7.1.4. Effet du glucose

A la fin des expériences et pour vérifier l'intégrité structurale des fragments jéjunaux montés en chambre de Ussing, nous avons testé l'effet du glucose, déposé à la concentration finale de 10 mM sur les faces muqueuses de ces tissus (figure 30).

Les résultats montrent une augmentation très significative ($p < 0,01$) de l'Isc. Ceci indique que les tissus sont bien conservés et gardent leur intégrité structurale et fonctionnelle. Et que le furosémide n'a pas d'effet toxique sur les cellules épithéliales et n'interfère pas avec le mécanisme d'action du glucose. Donc, les processus de cotransport glucose- Na^+ ainsi que l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase ne sont pas altérés.

2.7.1.5. Effet de la β -lg sur l'Isc des fragments jéjunaux de souris traitées

Les résultats obtenus montrent que le dépôt de la β -lg dans le versant séreux n'entraîne aucune modification significative de l'Isc des tissus de souris préalablement traitées à la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours et sensibilisé à la β -Lg (figure 31).

2.7.2. Mesure de la conductance

2.7.2.1. Effet de la sensibilisation à la β -Lg: Témoin positif

Les figures 32, et 33 représentent l'évolution de la conductance des tissus d'animaux stimulés à β -Lg. La conductance subit une augmentation significative avec un écart (Δ) $16,41 \pm 3,83 \text{mmho}/\text{cm}^2$ pour le T+ ($p < 0,001$). Les valeurs enregistrées passent de $26,79 \pm 1,97 \text{mmho}/\text{cm}^2$ à $43,20 \pm 5,56 \text{mmho}/\text{cm}^2$ (tableau 15b; figure 32).

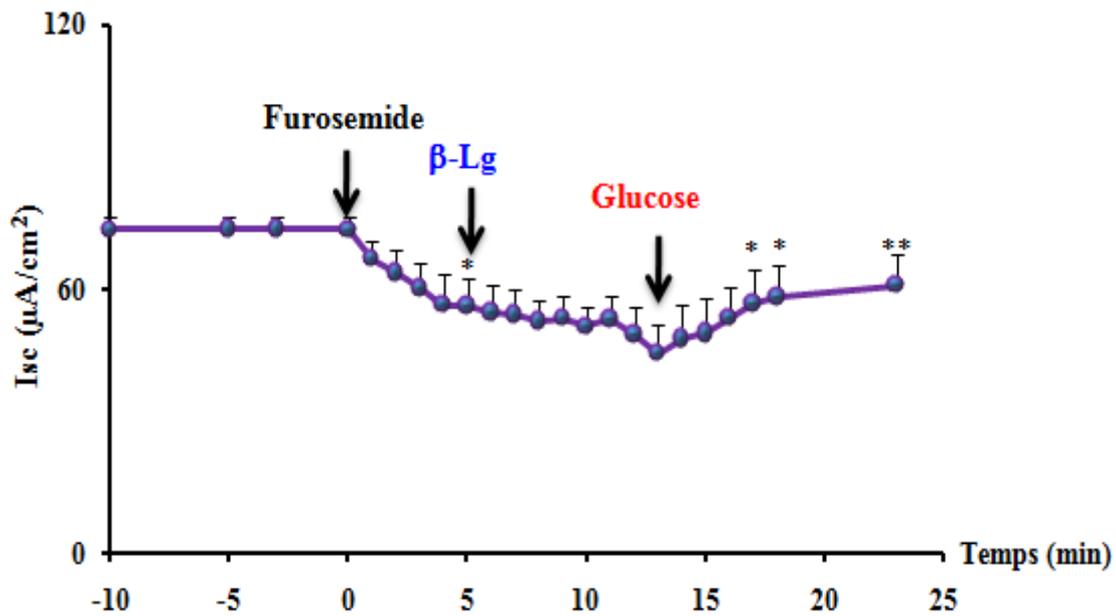


Figure 30. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court circuit, après dépôt du furosémide, sur des fragments jéjunaux de souris immunisées à la β -Lg mesuré en chambre de Ussing (n=6).

Le dépôt du furosémide inhibe l'augmentation de l'Isc après le dépôt de la β -Lg.

En fin d'expérience, le glucose est déposé à la concentration de 10 mM dans le compartiment muqueux. Une modification significative de l'Isc est observée.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

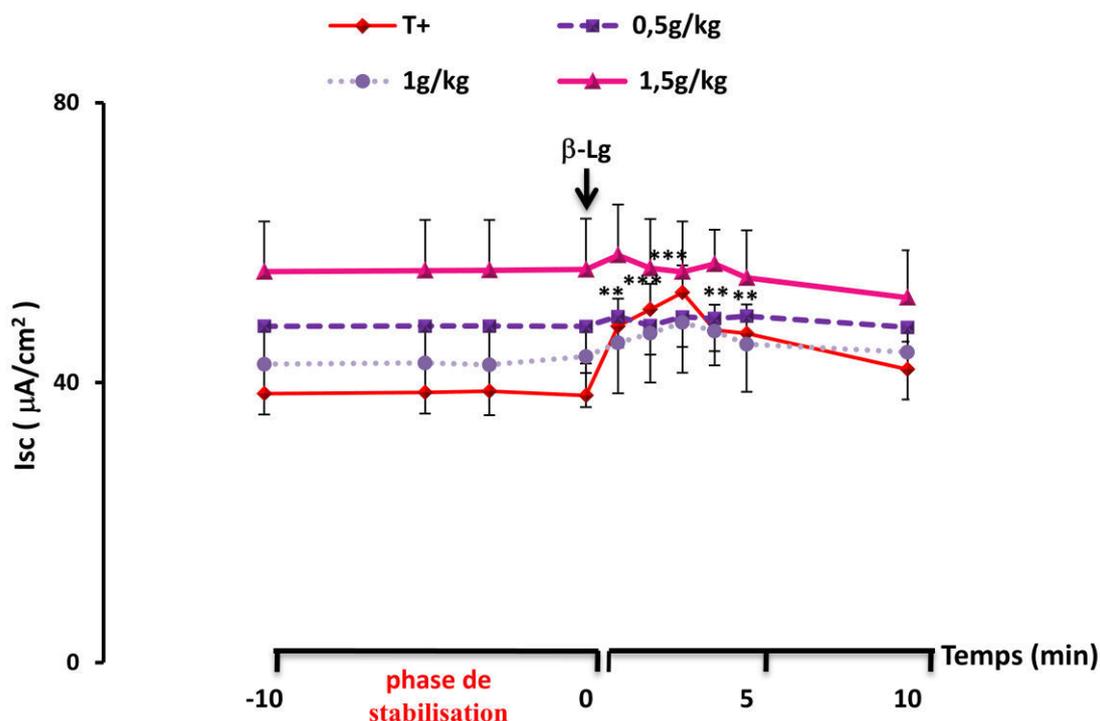


Figure 31. Effet de la β -Lg sur l'évolution du courant de court-circuit (Isc) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement traitées ou non à la gelée royale mesuré en chambre de Ussing.

Avant stimulation les valeurs de base de l'Isc sont recueillies pendant 10 minutes.

A $t = 0$, l'antigène sensibilisant (β -Lg) est déposé dans le versant séreux.

T+ : Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg.

GR 1,5g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

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

Chaque tissu est son propre témoin, les valeurs de l'Isc sont comparées à celle obtenue à T0.

****p<0,01 ***p<0,001.**

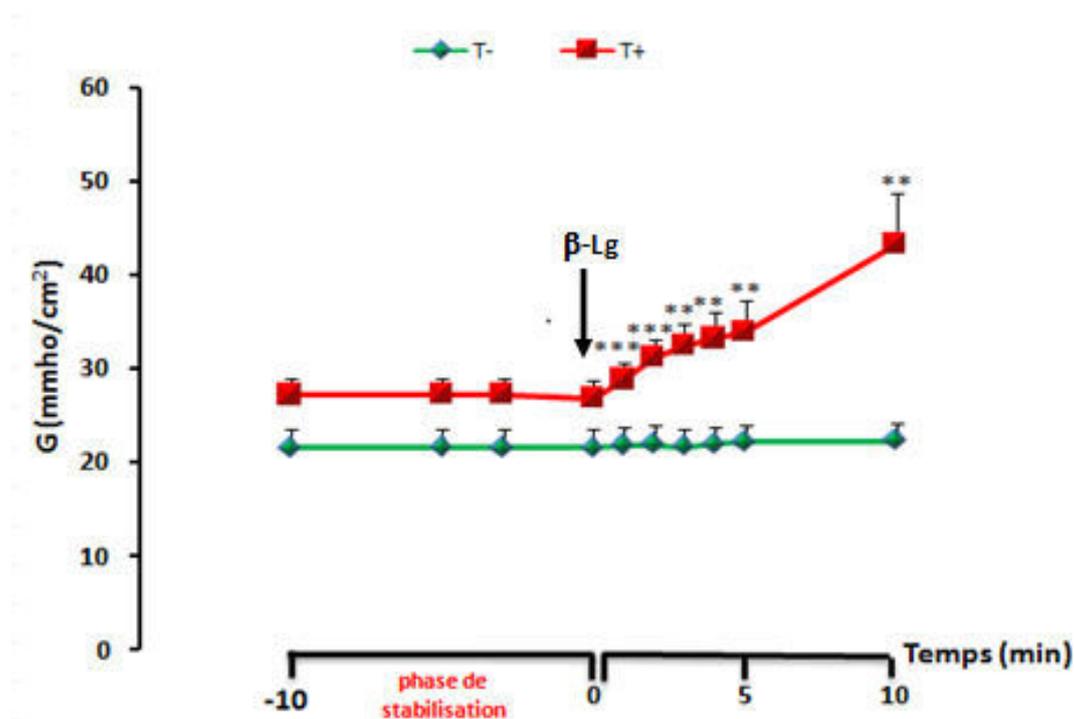


Figure 32. Effet de la β -Lg sur l'évolution de la conductance (G) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg (T+) ou non (T-), mesurée en chambre de Ussing.

Avant stimulation les valeurs de base de la G sont recueillies pendant 10 minutes.

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

T- : Tissus de souris non sensibilisées (Témoin négatif).

T+ : Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

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

Chaque tissu est son propre témoin, les valeurs de la G sont comparées à celle obtenue à T_0 .

**** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$**

2.7.2.2. Effet de la β -Lg sur la conductance des fragments jéjunaux de souris traitées

Après stimulation à la β -Lg, les valeurs de la conductance des tissus des souris immunisées et traitées avec de la gelée royale à différentes doses ne subissent aucune variation significative au cours du temps. Ces valeurs de base se montrent pratiquement identiques mais différentes de celle du groupe témoin négatif (tableau 15b, figure 33).

2.7.3. Effet sur la DDP

Nos résultats montrent que la mise en contact des tissus d'animaux sensibilisés à la β -Lg avec l'allergène ne produit aucune modification des valeurs de base de la DDP qui reste stable durant toute l'étude (tableau 16).

2.8. Etude histologique

L'étude histologique de la muqueuse intestinale permet d'évaluer un éventuel effet protecteur de la gelée royale contre les altérations tissulaires provoquées par la sensibilisation à la β -Lg.

2.8.1. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs

L'observation de la muqueuse intestinale des souris témoins négatifs, au microscope optique, révèle un aspect normal et régulier avec formation de nombreuses projections en doigts de gant: il s'agit des villosités séparées par les sillons intervillositaires communiquant.

Sur le plan structural, les villosités sont longues et fines et bordées par un épithélium uni-stratifié cylindrique, les lymphocytes du chorion sont peu abondants (figure 34).

2.8.2. Histologie de la muqueuse intestinale des souris témoins positifs

La muqueuse intestinale des souris témoins positives ayant reçue per os une solution saline puis sensibilisées à la β -Lg, montrent en premier lieu une augmentation massive de l'infiltrat inflammatoire au niveau du chorion pouvant entraîner une déformation des villosités avec une atrophie villositaire partielle. Cette atrophie est caractérisée par des villosités bordées par un épithélium ayant un aspect pseudostratifié et possède des cellules cubiques comportant des noyaux dystrophiques. De plus, une importante hyperplasie des cryptes est observée (figure 35). Ces résultats indiquent que l'immunisation par voie intrapéritonéale à la β -Lg affecte de manière significative la structure de base de l'épithélium intestinal

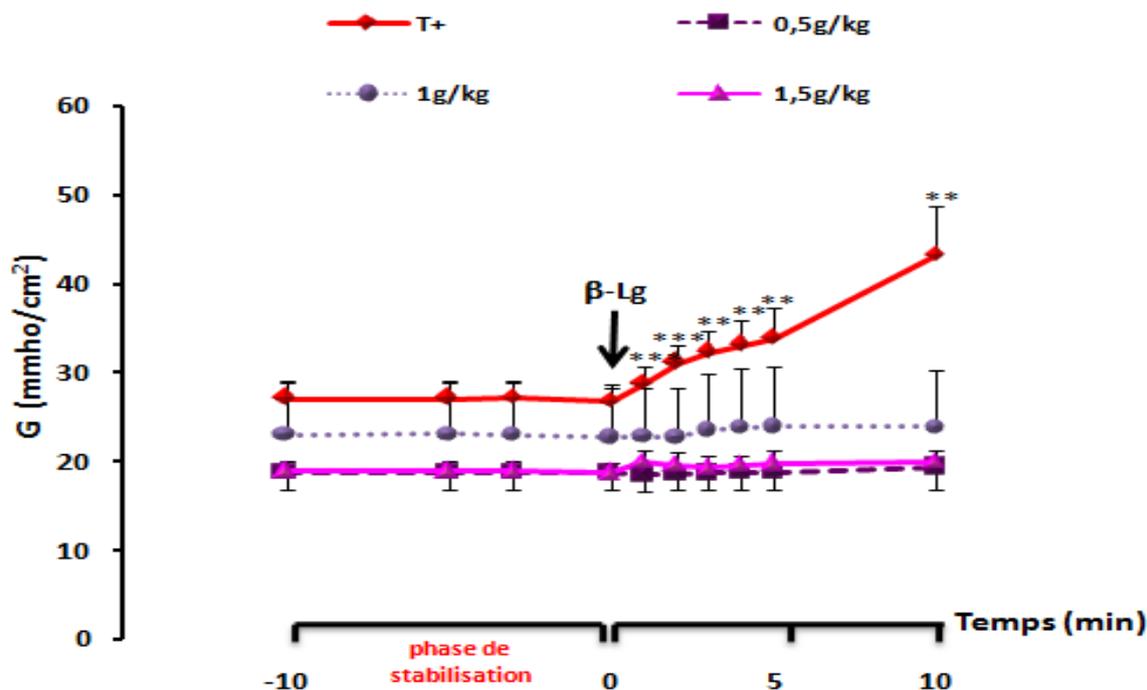


Figure 33. Effet de la β -Lg sur l'évolution de la conductance (G) des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg préalablement traitées ou non à la gelée royale mesuré en chambre de Ussing.

Avant stimulation les valeurs de base de la conductance sont recueillies pendant 10 minutes.

A $t = 0$, l'antigène sensibilisant (β -Lg) est déposé dans le versant séreux.

T+: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (Témoin positif).

GR 0,5g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 0,5 g/kg.

GR 1g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1 g/kg

GR 1,5g/kg: Tissus de souris sensibilisées à la β -lactoglobuline et préalablement traité à la gelée royale pendant 7 jours à la dose de 1,5 g/kg.

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

Chaque tissu est son propre témoin, les valeurs de la G sont comparées à celle obtenue à T0.

****p<0,01 ***p<0,001**

Tableau 15. Courant de court-circuit (a) et de la conductance (b) mesurés en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg prétraitées ou non avec de la gelée royale.

a) I_{sc} ($\mu A\ cm^{-2}$)			
Groupes	T_0	T_{MAX}	ΔI_{sc}
Témoin négatif	34,80 \pm 3,61	37,16 \pm 3,68	2,35 \pm 0,56
Témoin positif	38,17 \pm 3,21	54,78 \pm 3,55	16,60 \pm 1,13 ^{***}
GR 0,5g/kg	48,03 \pm 4,73	53,00 \pm 4,73	4,97 \pm 1,05 ^{###}
GR 1 g/kg	43,75 \pm 6,59	48,59 \pm 6,09	4,86 \pm 2,19 ^{###}
GR 1,5 g/kg	56,16 \pm 7,23	60,78 \pm 5,45	4,61 \pm 2,47 ^{###}

b) G (mmho/cm ²)			
Groupes	T_0	T_{MAX}	ΔG
Témoin négatif	21,54 \pm 1,98	22,73 \pm 1,95	1,18 \pm 0,21
Témoin positif	26,79 \pm 1,97	43,20 \pm 5,56	16,41 \pm 3,83 ^{***}
GR 0,5 g/kg	18,83 \pm 1,94	20,50 \pm 2,18	1,67 \pm 0,71 ^{###}
GR 1 g/kg	22,83 \pm 5,67	24,33 \pm 6,28	1,50 \pm 0,67 ^{###}
GR 1,5 g/kg	18,70 \pm 1,24	20,98 \pm 1,26	2,27 \pm 0,68 ^{###}

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standard (n=10).

Les variations de l' I_{sc} (ΔI_{sc}) ou celle de la G (ΔG) : représente la différence entre les valeurs maximales (T_{max}) enregistrées après la stimulation à la β -Lg et les valeurs de bases T_0 , c'est-à-dire les valeurs enregistrées au moment de la stimulation du tissu par la β -Lg à la concentration de 60 μ g/ml (compartiment séreux).

(ΔI_{sc} : T_{Max} vs T_0) (ΔG : T_{Max} vs T_0).

^{***} $p < 0,001$: GR 0,5g/kg, GR 1g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

^{###} $p < 0,001$: T+ vs T-

Tableau 16. La différence de potentiel (DDP) mesurés en chambre de Ussing sur des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la β -Lg prétraitées ou non avec de la gelée royale.

a)			
DDP (mV)			
Groupes	T₀	T_{MAX}	p
Témoin négatif	2,78±0,51	2.78 ± 0,50	NS
Témoin positif	3,02 ± 0,72	3,59 ± 0,90	NS
GR 0,5g/kg	3,31 ± 0,32	3,51 ± 0,31	NS
GR 1 g/kg	2,41±0,77	2,51 ± 0,72	NS
GR 1,5 g/kg	3,88 ± 0,29	4,00 ± 0,36	NS

Les valeurs rapportées sont des moyennes et leurs erreurs standard (n=10).

Les variations de la différence de potentiel (Δ DDP) : représente la différence entre les valeurs maximales (T max) enregistrées après la stimulation à la β -Lg et les valeurs de bases T₀, c'est-à-dire les valeurs enregistrées au moment de la stimulation du tissu par la β -Lg à la concentration de 60 μ g/ml (compartiment séreux).

(Δ DDP: T Max vs T₀).

NS: Non significatif.

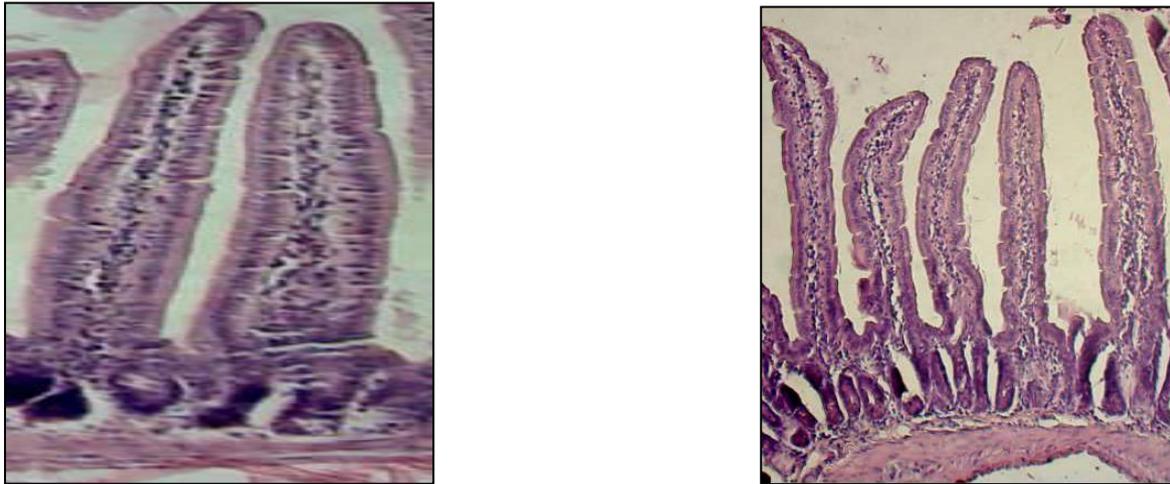


Figure 34. Observation microscopique (G×100) d'un fragment de jéjunum d'une souris du groupe témoin négatif (coloration à l'hémalun-éosine).

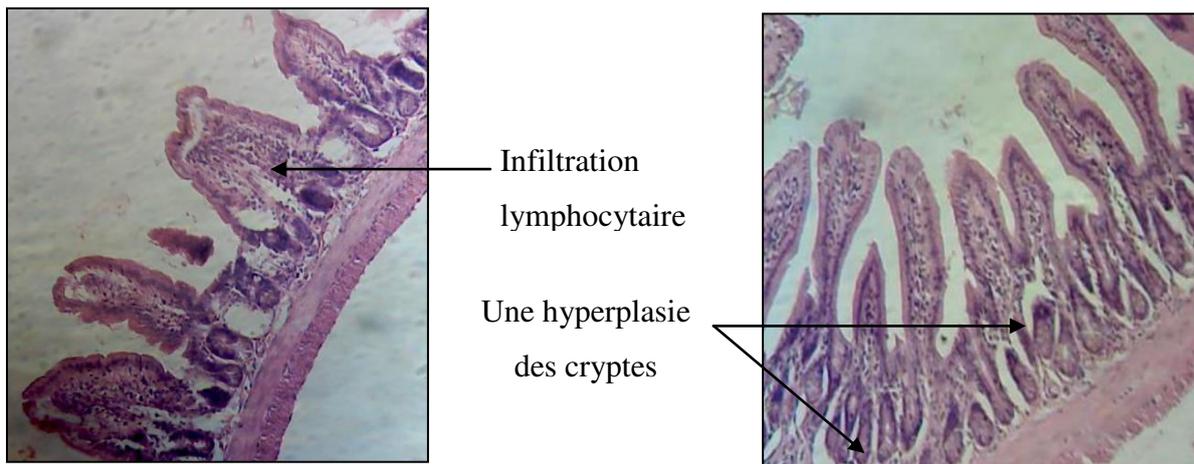


Figure 35. Observation microscopique (G×100) d'un fragment de jéjunum d'une souris du groupe témoin positif ayant reçu per os une solution saline puis sensibilisées à la β -Lg (coloration à l'hémalun-éosine).



2.8.3. Effet de la gelée royale sur la structure histologique de l'épithélium intestinal

Contrairement à ce que nous avons observé chez le témoin positif, les souris ayant reçu la gelée royale aux doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5 g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg, n'indiquent aucune altération de l'épithélium intestinal. En effet, la muqueuse intestinale apparaît formée de nombreuses projections en doigts de gants; il s'agit des villosités séparés par les sillons intervillositaires communiquant. L'infiltration lymphocytaire y est très peu marquée (figure 36). L'aspect de la muqueuse intestinale apparaît semblable à celui du groupe témoin négatif.

2.8.4. Mesure la hauteur villositaire.

Le relief villositaire au niveau du jéjunum peut être apprécié selon différents critères. La mesure de la hauteur villositaire constitue un critère essentiel puisqu'il peut renseigner sur l'existence éventuelle d'une atrophie villositaire chez les souris. Les mensurations des hauteurs sont effectuées sous un microscope optique muni d'un micromètre oculaire.

La hauteur villositaire mesurée au niveau de l'épithélium jéjunal est respectivement $62,75 \pm 1,72 \mu\text{m}$ et $41,50 \pm 2,36$ chez les groupes témoins négatifs et positifs.

Chez les groupes expérimentaux, la hauteur villositaire est semblable à celle du groupe témoin négatif. Elle est respectivement $59,90 \pm 1,78 \mu\text{m}$, $62,54 \pm 1,43 \mu\text{m}$ et $66,0 \pm 2,30 \mu\text{m}$ chez les souris sensibilisé à la β -Lg prétraitées à la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours (figure 37).

2.9. Comptage des mastocytes

Nos résultats montrent une augmentation significative ($p < 0,001$) du nombre des mastocytes au niveau du jéjunum chez les souris de groupe témoin positif (T+) comparé au groupe témoin négatif (T-) (figure 43). En plus, on remarque une abondance des mastocytes dégranulés par rapport aux mastocytes normaux au niveau du chorion suggérant une réponse allergique (figure 39).

Par contre, nos résultats montrent que l'administration orale de la gelée royale à différentes doses pendant 7 jours diminue significative le nombre des mastocytes ($p < 0,001$) par rapport aux témoins positifs (T+) (figure 40, 41, 42).

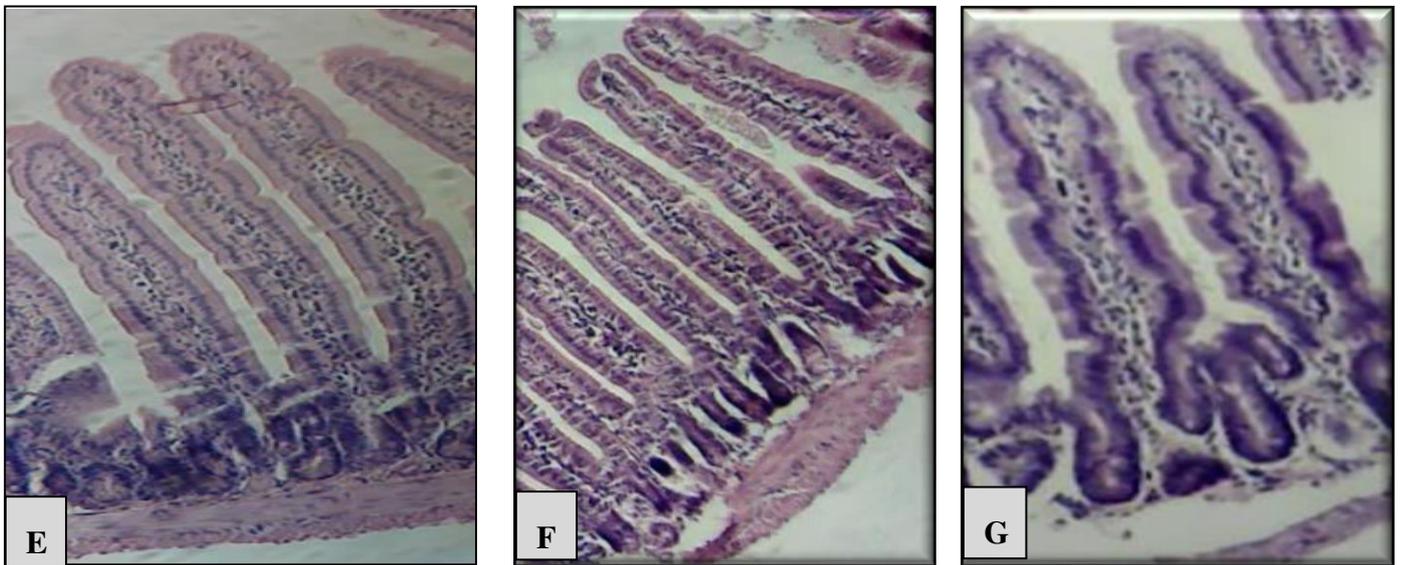


Figure 36. Observation microscopique ($G\times 100$) des fragments de jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale aux doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration à l'hémalun-éosine).

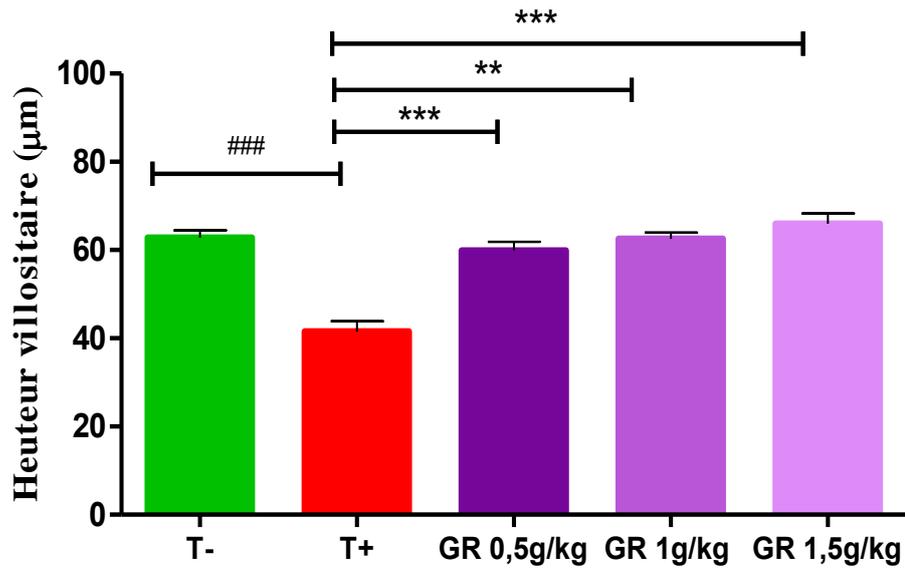


Figure 37. Hauteur villositaire des fragments de jéjunums chez les souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours (n=10).

******* $p < 0,001$: GR 0,5g/kg, GR 1g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

$p < 0,001$: T+ vs T-

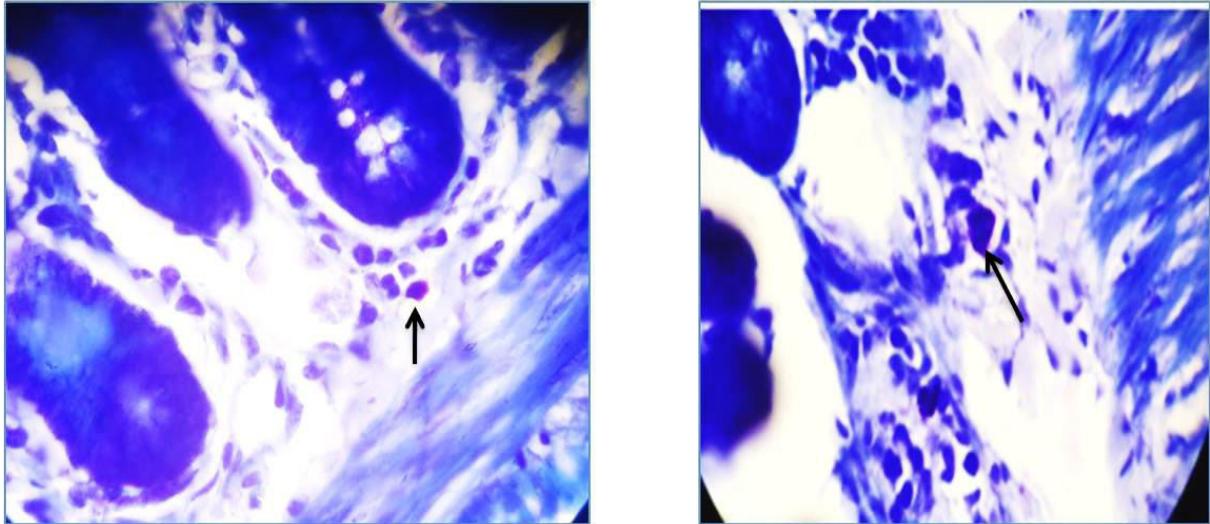


Figure 38. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris du groupe témoin négatif (coloration au bleu de toluidine).

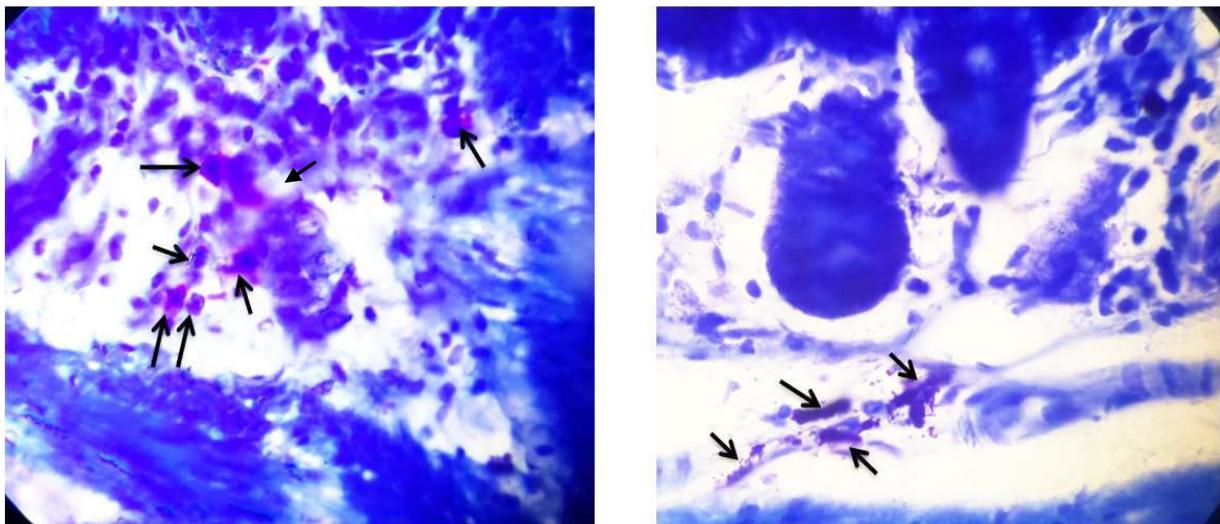


Figure 39. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris du groupe témoin positif (coloration au bleu de toluidine).

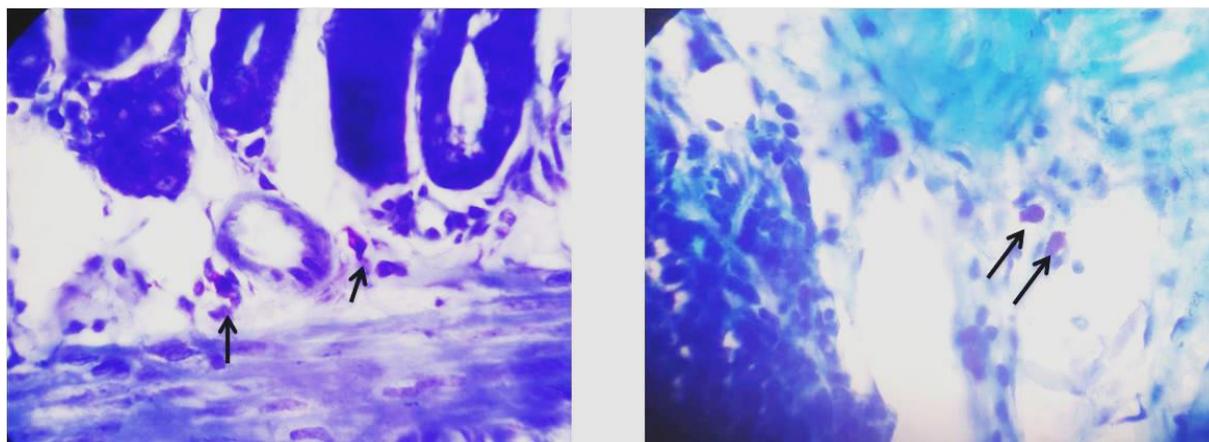


Figure 40. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 0,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).

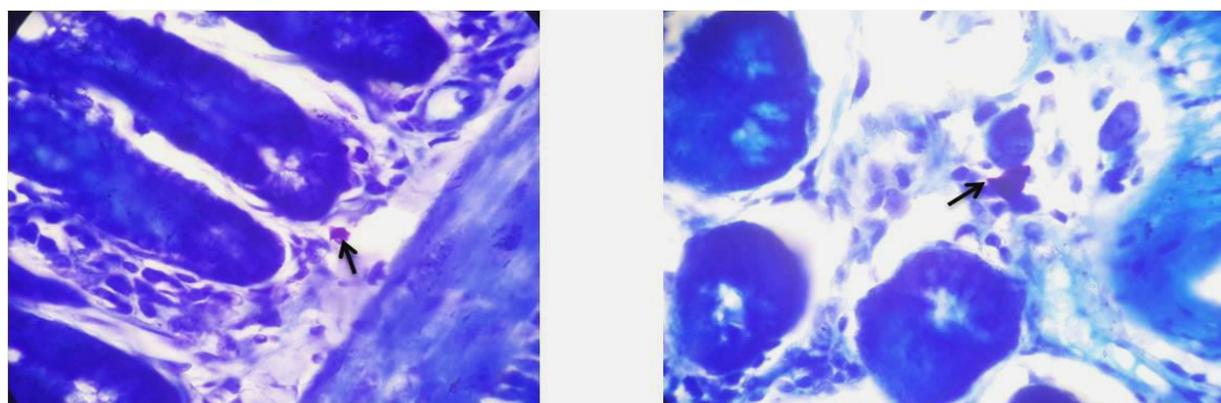


Figure 41. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 1g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).

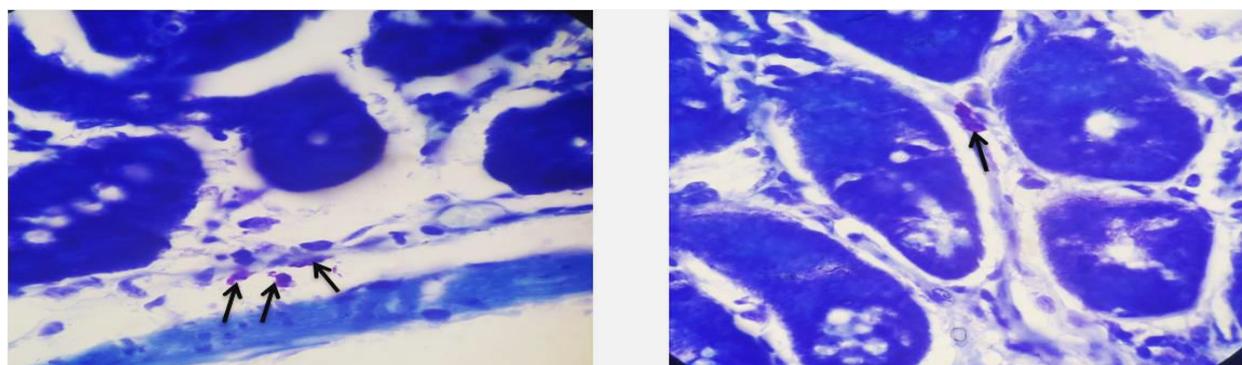


Figure 42. Observation microscopique (G×1000) des mastocytes au niveau des jéjunums des souris ayant reçu per os la gelée royale à dose de 1,5g/kg pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg (coloration au bleu de toluidine).

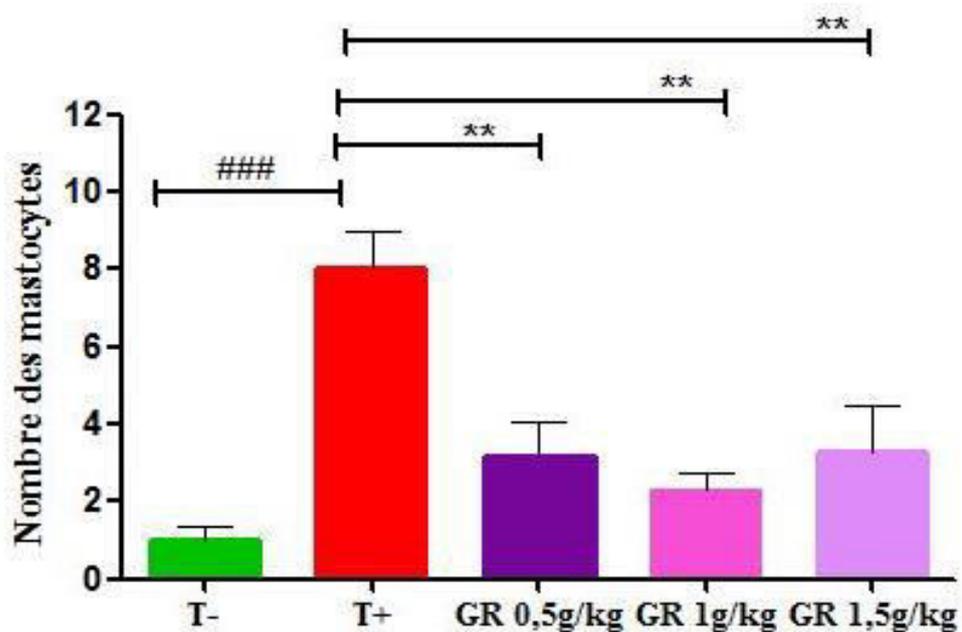


Figure 43. Nombre des mastocytes au niveau du jéjunum des souris sensibilisées à la β -lactoglobuline (T+) ou non (T-) et préalablement traitées à la gelée royale à différentes doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

****p<0,01:** GR 0,5g/kg, GR 1g/kg et GR 1,5g/kg vs T+

p<0,001: T+ vs T-

Discussion

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des paramètres physico-chimiques de la gelée royale ainsi que son effet immunomodulateur chez la souris Balb/c sensibilisée par voie intrapéritonéale à l'une des principales protéines allergisantes du lait de vache ; la β -Lg. La gelée royale a été administrée par gavage gastrique pendant 7 jours aux doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg.

1. Etudes physico-chimiques de la gelée royale

Avant tout, il est important de rappeler que la gelée royale utilisée dans le cadre de ce travail est fraîche et n'a subi aucun traitement préalable. De nombreux facteurs, notamment la race de l'abeille, la saison, les conditions de stockage, les conditions régionales et le type de la flore pollinifère sont susceptibles d'affecter la composition de la gelée royale (Shibi et al., 1993; Chen et Chen, 1995; Wongchai et Ratanavalachai, 2002; Jianke et al., 2003; Ramadan et Al-Ghamdi, 2012; Lian-Fei, 2016).

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié quelques paramètres physicochimiques de la gelée royale issue de deux régions (Blida et Boumerdès) par mesure de l'acidité libre, du pH, de la cendre et de la teneur en eau ainsi que le taux des lipides, des sucres, des polyphénols et des protéines.

Nos résultats montrent que la gelée royale récoltée dans les deux régions est acide et enregistre un pH voisin de 3. Cette acidité est due à la présence des acides organiques tels que l'acide pantothénique (vitamine B5) et l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-2HDA) contenus dans la gelée royale. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Metry et Owayss (2009), Sabatini et al. (2009), Mărghitaș et al. (2010), Ramadan et Al-Ghamdi (2012), Nabas et al. (2014), Stratev et al. (2015) et Mureșan et al. (2016). De plus, et selon les travaux de Wongchai (2002), le pH de la gelée royale de Thaïlande reste constant durant une année de conservation.

L'eau est l'un des composants majeurs de la gelée royale. La constante relative de l'humidité est due à la rapidité de la synthèse de la gelée royale et de sa distribution aux larves (Ramadan et Al-Ghamdi, 2012). Bien que nos résultats montrent que la gelée royale de Boumerdès est plus riche en eau que celle de Blida, ils demeurent en accord avec ceux cités dans la littérature (Popescu et al., 2008b; Sabatini et al., 2009; Ramadan et Al-Ghamdi, 2012; Balkanska et al., 2014; Nabas et al., 2014; Ait Soura et Mecellem, 2017).

Le taux d'humidité de la gelée royale répond aux exigences fixées par la législation brésilienne (60 et 70%) (Commission brésilienne, 2000). L'humidité de la gelée royale dépend de la saison de récolte. Elle augmente dans la saison pluvieuse et diminue dans la saison chaude (Wongchai, 2002). Bien que Ferioli et al. (2007) suggèrent que la teneur en eau diffère selon l'origine de la gelée royale, aucune différence significative dans teneurs en eau n'a été enregistrée entre les échantillons italiens et ceux des pays non européens.

La littérature citée rapporte que les minéraux présents dans la gelée royale représentent environ 0,8 à 3% de celle-ci (Sabatini et al., 2009). Les éléments majoritairement retrouvés sont par ordre décroissant le potassium, le calcium, le sodium, le magnésium, le zinc, le fer, le cuivre, et le manganèse. La détermination des cendres offre la possibilité de connaître la teneur en matière minérale globale de la gelée royale. Garcia-Amoedo et Almeida-Muradian (2007) montrent que l'origine n'a pas d'impact sur la quantité totale de minéraux dans la gelée royale. Nos résultats montrent que les taux des constituants minéraux de nos échantillons sont en concordance avec ceux de Messia et al. (2003), Popescu et al. (2008a), Sabatini et al. (2009) et Yang et al. (2017).

La teneur en glucides totaux de nos échantillons varie de 8,88 à 8,90 %. Ces valeurs sont en accord avec ceux trouvés par la littérature (Sabatini et al., 2009; Wytrychowski et al., 2013). En revanche, la teneur en glucides de nos échantillons est inférieure à celle de la Roumanie rapportée par Mărgăoan et al. (2017).

Les lipides de la gelée royale sont présents à des concentrations assez modestes et variables (3 à 8%), et représentent sans doute un des plus importants composants de la gelée royale (Tamura et al., 2009; Sabatini et al., 2009). L'acide 10-hydroxy-trans-2-décénoïque (10H2DA) représente l'acide gras le plus important de la gelée royale en raison des propriétés biologiques, notamment antibactériennes, antifongiques et anti-tumorales, qui lui sont attribuées (Barker et al., 1959; Bărnăuțiu et al., 2011).

Nos résultats montrent une teneur en lipides qui varie entre 3,64 et 3,74% avec une différence significative ($p < 0,05$) entre la gelée royale de Blida et celle de Boumerdès. Ces valeurs sont en accord avec celles citées dans la littérature (Viuda-Martos et al., 2008; Sabatini et al., 2009; Ramadan et Al-Ghamdi, 2012; Balkanska et al., 2014; Kolayli et al., 2016), mais semblent être inférieures à celles de la Roumanie rapportées par Mărgăitaș

et al. (2010). Les variations saisonnières peuvent également affecter la composition chimique de la gelée royale en lipides. En effet, la teneur en lipides augmente dans la saison chaude et diminue dans la saison pluvieuse (Wongchai, 2002).

Dans le cadre de ce travail, nous avons apprécié également la quantité de composés phénoliques contenus dans les échantillons de gelée royale. Les composés phénoliques constituent la base des principes actifs chez les plantes médicinales. Ces molécules présentes en traces ont un impact direct sur la qualité nutritionnelle des produits alimentaires et leurs effets positifs sur la santé sont incontestables (Macheix et al., 2005). En effet, les composés phénoliques de la gelée royale sont collectés par les abeilles à partir des plantes où le nectar (Fiorani et al., 2006).

La teneur en composés phénoliques de nos échantillons est supérieure à celle de la Jordanie (Nabas et al., 2014), mais elle est semblable aux valeurs mentionnées dans l'étude de Liu et al. (2008). Par contre, les travaux de Pavel et al. (2014) réalisés sur la gelée royale de la Roumanie, montrent une teneur en composés phénoliques 100 fois plus que celle citée dans la littérature.

Toutefois, il semble que le contenu polyphénolique de la gelée royale soit très variable. En effet, à ce jour aucune valeur précise et définie n'a pu être déterminée en raison du faible nombre de données rapportées dans la littérature sur le contenu polyphénolique de la gelée royale.

Les variations des teneurs en composés phénoliques rapportées dans la littérature peuvent être attribuées à l'origine florale ou à la saison de la récolte et la variété des méthodes utilisées dans chaque étude.

Les composants phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes, anti-agrégantes plaquettaires, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-tumorales et anti-thrombotiques. C'est ce qui justifie son utilisation croissante en thérapeutique (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

D'autre part, d'un point de vue quantitatif, les protéines font partie des constituants majeurs de la gelée royale. Nos résultats indiquent que les teneurs en protéines de la gelée royale des deux régions (Blida et Boumerdès) sont de l'ordre de 14,04 à 14,81%. Ces valeurs

sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (9 à 18%) (Takenaka et Takenaka, 1996; Sabatini et al., 2009; Balkanska et al., 2013; Pavel et al., 2014; Kanelis et al., 2015; Mărgăoan et al., 2017; Yang et al., 2017).

Afin de vérifier la méthode la plus fiable pour le dosage des protéines totales de la gelée royale, deux méthodes différentes sont utilisées (Kjeldahl et Lowry). Aucune différence significative n'est observée entre les résultats obtenus des deux techniques de dosage. Garcia-Amoedo et Almeida-Muradian (2007), montrent par un dosage par micro-Kjeldahl du taux d'azote que le taux de protéines atteint une moyenne de 13,12 % sans réelle variation selon l'origine des échantillons.

Dans notre travail, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl-sulfate (SDS-Page) a été réalisée afin d'identifier les principales protéines contenues dans la gelée royale.

L'analyse des bandes électrophorétiques de nos échantillons montre clairement l'existence de 3 protéines majeures de la gelée royale: MPRJ2, MPRJ3 et MPRJ5 correspondant aux poids moléculaires (PM) de 49, 68 et 80 kDa respectivement. Alors que dans les conditions dénaturantes avec l'agent réducteur (β -mercaptoéthanol), on observe l'existence de 2 protéines majeures de la gelée royale: MPRJ2 et MPRJ3. Sauf que dans ces conditions, il n'est pas possible de séparer et identifier les autres protéines par cette technique en raison de la proximité de leurs PM.

La gelée royale est fortement riche en protéines qui sont représentées dans un groupe de 5 protéines (MRJP: Major Royal Jelly Proteins), maintenant appelées alalbumines avec une proportion de 80% et un poids moléculaire qui varie de 49 à 87 kDa (Simuth et al., 2001; Gharbi, 2011), mais également des protéines de faibles poids moléculaires (Amigou, 2016).

L'étude de Nozaki et al. (2012), démontre que l'ultracentrifugation de la gelée royale pendant 1 heure entraîne une séparation visible du surnageant en trois couches. Les couches supérieure et intermédiaire présentent une forte concentration en MRJP2 (52 kDa) et en MRJP3 (60-70 kDa). Par contre, la MRJP1 (55 kDa) qui a un poids moléculaire similaire à MRJP2 et MRJP3 est présente dans la couche inférieure sous la forme d'un oligomère.

Afin d'identifier et de séparer la protéine MRJP1 par Western blot, Shen et al. (2015) a produit un anticorps spécifique anti-MRJP1 qui se lie spécifiquement et uniquement à cette

protéine, contrairement à l'anticorps anti-R-MRJP1 précédemment rapporté par Li et al. (2008) qui se lie à presque tous les membres de la famille MRJP.

Le rôle nutritionnel des MRJP est attribué à leur teneur importante en acides aminés essentiels. En outre, MRJP1 est capable de favoriser la régénération du foie et d'assurer une action cytoprotectrice sur les hépatocytes (Fujii et al., 1996; Kimura et al., 1995). Quant à la MRJP3, elle présente des effets anti-inflammatoires puissants *in vitro* et *in vivo*.

Les valeurs moyennes de la composition chimique générale de la gelée royale collectées dans cette étude sont quelque peu comparables à celles des échantillons de la gelée royale produits dans d'autres pays tels que la Bulgarie, le Brésil, la Roumanie, la Thaïlande et l'Italie (Wongchai, 2002; Garcia-Amoedo et Almeida-Muradian, 2007; Sabatini et al., 2009; Balkanska et al., 2013; Pavel et al., 2014).

Quelques légères différences entre ces valeurs peuvent être dues à diverses conditions telles que la procédure de collecte, les procédures analytiques et les lieux de production de la gelée royale, qui dépendent de la fertilité du sol, du climat et des sources florales. Toutes ces variances peuvent influencer la composition du pollen et du nectar entrant dans la nourriture des abeilles nourricières qui sécrètent la gelée royale.

2. Etude des propriétés immunomodulatrices de la gelée royale

Dans notre travail, nous avons choisi la souris femelle de souche Balb/c, comme modèle d'allergie aux protéines du lait de vache, car elle est caractérisée par un complexe majeur d'histocompatibilité relativement proche de celui de l'Homme et par une balance Th1/Th2 plus nette et plus facile à mettre en évidence que chez l'Homme (Magnan et Vervlo et, 1997). Ce modèle animal a été développé et validé par l'équipe d'Adel-Patient et al. (2005). Cette étude a montré que la sensibilisation par voie intrapéritonéale et orale des souris Balb/c induit l'activation de la voie Th2 en produisant des quantités d'IgE et des IgG1 spécifiques ainsi que la production d'interleukines (IL4 et IL5) spécifiques à ce type de réponse immune (Th2).

Pour la sensibilisation des souris à la β -Lg, nous avons choisi la voie intrapéritonéale en présence d'hydroxyde d'aluminium, car elle est facile d'utilisation 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, 2003; Chen et al., 2013).

Le degré de sensibilisation des souris à la β -Lg a été évalué par une méthode immuno-enzymatique (ELISA). Nos résultats montrent que l'immunisation intrapéritonéale à la β -Lg conduit à une production importante d'IgE totales, IgG et d'IgE anti- β -Lg, l'ensemble de ces résultats plus la présence d'un test cutané positif confirment le pouvoir fortement immunogène de cette protéine. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Frossard et al. (2004a) qui ont observé chez des souris 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 trouvés par Negaoui et al. (2009) et Grar et al. (2015) qui ont montré que l'immunisation des souris Balb/c avec les protéines du lait vache induit une augmentation significative des titres sérique en anticorps IgG et IgE anti β -Lg.

Des tests cutanés sont utilisés dans plusieurs études pour confirmer la réaction d'hypersensibilité du type 1 induite par différents aliments ainsi que d'autres allergènes chez la souris (Jensen-Jarolim et al., 1999; Wiedermann et al., 1998; Kumar et al., 2014).

Rappelons que la réaction allergique aux protéines de lait de vache IgE médiée s'effectue classiquement en deux phases: la sensibilisation et la réaction allergique proprement dite.

Dans la phase de sensibilisation, les allergènes sont présentés par les cellules dendritiques aux lymphocytes T naïfs, qui vont se différencier en CD4 Th2 activés dans un environnement cytokinique Th2 (IL4) (Hadis et al., 2011). Ces derniers vont à leur tour activer les lymphocytes B, entraînant une induction et leur différenciation terminale en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques d'allergène. Les IgE spécifiques circulent dans l'organisme et se fixent sur leurs récepteurs de haute affinité (Fc ϵ RI), exprimés par les basophiles circulants et les mastocytes muqueux (Adel-Patient, 2016). Cette première étape n'occasionne aucun signe clinique (cliniquement muette), son rôle est de préparer l'organisme à réagir de façon immédiate lors d'un futur contact avec le même allergène.

Lors d'une seconde exposition, les protéines lactées arrivent au niveau de la muqueuse du tube digestif. L'antigène fixe l'IgE spécifique sur le mastocyte via un récepteur de haute affinité (Fc ϵ RI) et le pontage de deux IgE délivre un signal d'activation du mastocyte

et entraîne la libération des médiateurs pro-inflammatoires (Burks, 2003; Untersmayr et Jensen-Jarolim, 2006; Molkhov, 2009; Reber et al., 2017). Ces médiateurs sont responsables des signes cliniques de l'APLV. Ils vont provoquer une vasodilatation périphérique, une augmentation de la perméabilité vasculaire, l'adhésion leucocytaire et la contraction des muscles lisses, particulièrement au niveau des bronches (Tomasi et al., 1980; Kanny, 2007; Blank et Vitte, 2014).

Nos résultats montrent que le test de provocation *in vivo* par voie intrapéritonéale à la β -Lg réalisé sur les souris immunisées aux protéines du lait bovin, induit des symptômes cliniques sévères allant jusqu'au stade 4 avec une baisse rapide de la température corporelle. Celle-ci est due à une réaction allergique médiée par les IgE qui déclenche une cascade de médiateurs de l'inflammation responsable de ces signes cliniques. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Thang et Zhao (2015) qui ont montré que l'étude de la réaction allergique par la réalisation d'un test de provocation par voie orale à la β -Lg chez des souris immunisées a révélé des manifestations cliniques importantes et une baisse de la température rectales. Selon Frossard et al. (2004b), la température corporelle est un marqueur sans doute plus objectif de l'allergie alimentaire.

Nos résultats sont également en accord avec ceux trouvés par Van Esch et al. (2011) et Van Esch et al. (2013) qui ont montré que la sensibilisation des souris par voie orale au lactosérum entraîne une forte production d'anticorps sériques de type IgG1 et IgE spécifiques avec apparition de symptômes cliniques sévères et une chute rapide de la température corporelle suite au test de provocation intradermique réalisé.

Cependant, les taux des anticorps sériques de type IgE totales, IgG et IgE spécifiques anti β -Lg sont inférieurs de façon très significative à ceux enregistrés chez les souris immunisées ayant reçu la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours.

Nos résultats ont été confirmés et validés par l'équipe d'Okamoto et al. (2003) qui a montré que la protéine majeure de la gelée royale 3 inhibe la production des IgE et IgG1 dirigés contre l'ovalbumine (OVA) en inhibant la libération d'IL4 *in vitro*.

Dans le même contexte, Oka et al. (2001) ont montré que la gelée royale supprime la production IgE anti-DNP-KLH (dinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin) et la libération d'histamine à partir des mastocytes, en association avec la restauration de la

fonction des macrophages et l'amélioration des réponses cellulaires Th1/Th2 chez les souris immunisées à la DNP-KLH.

Une étude faite par Kataoka et al. (2001) a démontré que l'administration intrapéritonéale de la gelée royale diminue le risque de sensibilisation allergique ainsi que le taux des anticorps notamment les IgG1 spécifiques à l'OVA et la production d'IgE ainsi que la production des cytokines de type Th2, telles que les IL4, IL5 par les cellules de la rate stimulées avec de l'OVA.

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

Il est admis que l'histamine agit comme activateur puissant de la réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales. En effet, L'augmentation des niveaux d'histamine reflète la dégranulation des mastocytes et augmente la perméabilité vasculaire, ce qui entraîne l'aggravation des réactions allergiques. De nombreux rapports suggèrent que les réactions allergiques, par conséquent, peuvent être réduites par la suppression de la libération d'histamine.

Dans le cadre de ce travail, nous avons également évalué l'effet de la gelée royale sur le taux d'histamine plasmatique et la perméabilité vasculaire chez des souris sensibilisées à la β -Lg. Nos résultats montrent que l'administration orale de la gelée royale à différentes doses diminue de manière significative les taux plasmatiques d'histamine et de la perméabilité vasculaire et par conséquent, réduit les manifestations de l'allergie aux protéines de lait de vache.

Dans un autre volet de ce travail, nous avons évalué *ex vivo* en chambre de Ussing, l'effet de la gelée royale sur la réaction intestinal locale chez les souris sensibilisées à la β -Lg. L'utilisation de la chambre de Ussing nous permet d'étudier l'interaction de l'antigène sensibilisant (β -Lg) avec les cellules immunocompétentes de la muqueuse jéjunale intestinale de notre modèle animal et de préciser cette action sur les mouvements des électrolytes (sodium et chlore) reflétés par le courant de court-circuit.

De plus, les paramètres électrophysiologiques (Isc, G, DDP) permettent de contrôler tout au long de l'expérience la viabilité du tissu. En effet, la conductance ou la résistance 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.

Nos résultats montrent très clairement que lorsqu'on expose des fragments jéjunaux des souris immunisées à l'action de la β -Lg dans le compartiment séreux, une forte activité électrogénique en résulte. Elle est reflétée, dans notre travail, par une augmentation très significative du courant de court-circuit (Isc) et est spécifique à l'antigène sensibilisant. Cette spécificité a été vérifiée par l'utilisation de l'ovalbumine comme stimulant où l'Isc reste stable durant toute la durée de l'expérience.

On peut traduire cette augmentation de l'Isc par le fait que la 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.

Ces résultats concordent avec d'autres travaux effectués *ex vivo* chez la souris Balb/c (Negaoui et al., 2009; El Mecherfi et al., 2014; Grar et al., 2015; Negaoui et al., 2016) qui ont montré que la mise en contact du fragment intestinal de l'animal immunisé avec la β -Lg, augmente de manière significative les valeurs du courant du court-circuit et que cette augmentation est induite par une hypersécrétion de chlorure.

Les réactions anaphylactiques qui surviennent au cours de l'allergie alimentaire sont associées à une augmentation de transport ionique épithélial avec une sécrétion passive de l'eau. Ceci est responsable des symptômes cliniques notamment la diarrhée (Perdue et al., 1991; Yu et Perdue, 2001). Les médiateurs libérés par les mastocytes, tels que l'histamine et les prostaglandines, sont impliqués dans la stimulation de la sécrétion d'ions épithéliaux (Castro et al., 1987; Crowe et al., 1990; Yu, 2009).

Dans le cadre de ce travail, les résultats obtenus montrent que le nombre de mastocytes au niveau du jéjunum des souris de groupe témoin positif est significativement plus élevé ($p < 0,001$) par rapport aux souris de groupe témoin négatif. Ces résultats concordent avec les travaux d'Adel-Patient et al. (2011) qui montrent que l'administration de la β -Lg par voie orale en présence de toxine cholérique comme adjuvant a induit une augmentation du nombre des mastocytes intestinaux chez la souris C3H/HeOuJ.

En revanche, Aucune modification significative des valeurs du courant de court-circuit (I_{sc}) n'a été observée chez les souris qui ont reçu la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours et ensuite sensibilisées à la β -Lg, suggérant une diminution de la réponse anaphylactique locale induite par la β -Lg. Cette diminution est probablement due à la diminution de nombre des mastocytes intestinaux. Compte tenu de nos résultats montrant une diminution significative du nombre des mastocytes totaux chez les souris prétraitées à la gelée royale à différentes doses comparé au contrôle positif.

L'étude d'Ahrens et al. (2012) a montré l'existence d'une corrélation positive entre le nombre de mastocytes intestinaux et le développement de symptômes systémiques de l'anaphylaxie principalement la diarrhée, la fuite vasculaire et l'hypothermie.

Nos résultats concordent avec ceux de Karaca et al. (2010) qui ont montré que l'administration de la gelée royale par voie orale diminue le nombre des mastocytes et réduit le domaine de l'érosion du côlon chez les rats atteints de la colite.

Il est admis que le mastocyte est un acteur majeur des réactions allergiques immédiates et tardives (Shea-Donohue et al., 2010; Gilfillan et Beaven, 2011). Une fois activés, les mastocytes entraînent le processus de dégranulation qui provoque la libération de médiateurs telle que l'histamine qui est considérée comme le médiateur majeur du choc anaphylactique, ainsi qu'une grande variété d'autres médiateurs inflammatoires tels que les leucotriènes, les prostaglandines, les protéases et plusieurs cytokines pro-inflammatoires et chimiotactiques (Kim et al., 2005; Kalesnikoff et Galli, 2008; Xue et al., 2018).

L'histamine possède des effets directs et indirects sur le transport épithélial des ions. Elle augmente directement la sécrétion du chlore au niveau de la lignée cellulaire T-84 par un processus dépendant du calcium (Dharmasathaphorn et al., 1989). La liaison de l'histamine à son récepteur membranaire H1 entraîne l'élévation intercellulaire du Ca^{++} et l'activation de la kinase C (Wasserman et al., 1988).

Afin de connaître la nature de l'augmentation de l' I_{sc} , nous avons testé l'action d'une substance pharmacologique; le furosémide à la concentration finale de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Ce diurétique est connu pour agir rapidement sur l'inhibition du cotransporteur Cl/Na/K au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocytes. Suite au dépôt du furosémide, une diminution significative de l' I_{sc} a été observée ce qui permet 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 (2017), qui ont montré que lorsque le furosémide est ajouté, l'Isc des fragments jéjunaux de souris sensibilisées à la lactoferrine bovine (bLf) diminue après la stimulation antigénique.

La mesure de la conductance (G) ou de la résistance membranaire (DDP) apporte des informations d'une part sur l'état physiologique de la membrane et d'autre part sur les mécanismes de passage de molécules actives (Moazed et Hiebert, 2007). Ainsi que l'impact de ces molécules sur l'intégrité membranaire.

Nos résultats montrent que la conductance des tissus étudiés après stimulation par l'antigène sensibilisant augmente de manière significative. Cette augmentation est le résultat d'un relâchement des tissus sensibilisés, interprétée physiologiquement comme étant une augmentation de la perméabilité intestinale (Negaoui et al., 2009; El Mecherfi et al., 2014).

De même, Saidi et al. (1995) ont montré que la stimulation des fragments jéjunaux de nourrissons allergiques aux protéines de lait de vache avec la β -Lg induit une augmentation de la sécrétion de Cl^- et une augmentation de la conductance. Et selon les travaux de Poonyachoti et Brown (2001), l'augmentation de la conductance produite par l'adjonction de la β -lg n'est pas médiée par l'histamine. Il semblerait que cette augmentation de la conductance soit due à l'altération des jonctions serrées des cellules épithéliales. La libération de médiateurs par les mastocytes, autres que l'histamine, sont capables d'altérer la perméabilité intestinale par des mécanismes non neuronaux. L'IL4, le TNF- α et l'INF- γ sont parmi les médiateurs impliqués dans ces effets.

Lors des réactions allergiques, l'augmentation de la perméabilité intestinale est associée à l'existence d'une inflammation de la muqueuse et à la rupture de la tolérance orale (Jalonen, 1991; Majamaa et Isolauri, 1996; Kalach et al., 2001).

Dans notre présente étude, le test de provocation *ex vivo* en chambre de Ussing montre que l'administration orale de la gelée royale à différentes doses semble atténuer l'augmentation de la conductance induites par la β -lg, ce qui laisse suggérer une prévention d'altération de la barrière intestinale et une diminution de la perméabilité de la voie paracellulaire au niveau des jonctions serrées.

La dernière partie de notre travail consiste à l'évaluation de l'effet préventif de la gelée royale contre les altérations tissulaires au niveau du jéjunum provoquées par la protéine sensibilisante (β -Lg).

Nos résultats montrent une infiltration des lymphocytes intra-épithéliaux au niveau du chorion, une atrophie villositaire partielle, ainsi qu'une hyperplasie des cryptes chez le groupe de souris sensibilisées. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Addou et al. (2004); Negaoui et al. (2009); Dib et al. (2014); Benaïssa et al. (2018); Haddi et al. (2018).

Des manifestations similaires sont observées chez les rats au cours de l'anaphylaxie due aux antigènes alimentaires (Crow et al., 1994; Levine et Saltzman, 1998; Sakamoto et al., 1998).

Plusieurs études publiées montrent que l'allergie alimentaire chez la souris est caractérisée par une atrophie des villosités et une hyperplasie des cellules caliciformes, ainsi qu'une infiltration de mastocytes IgE-positifs qui libèrent de l'histamine suite à leur dégranulation (Nakajima-Adachi et al., 2008, Huang et al., 2010, Chen et al., 2012, Grar et al., 2015). Habituellement, les réactions allergiques alimentaires IgE-dépendantes affectent un ou plusieurs organes cibles tels que la peau, les voies respiratoires, le tube digestif et le système cardiovasculaire (Sicherer, 2002).

Nos résultats montrent également que l'aspect de la muqueuse intestinale des souris ayant reçu la gelée royale aux doses 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg par voie orale pendant 7 jours puis sensibilisées à la β -Lg n'est pas affecté tels que les témoins positifs. En effet, les villosités sont de plus en plus longues et fines avec une augmentation hautement significative de la hauteur villositaire par rapport au groupe témoin positif et une infiltration lymphocytaire similaire au groupe témoin négatif.

La gelée royale exerce des effets protecteurs contre les lésions tissulaires (Ghanbari et al., 2016a, 2016b), toutefois, le mécanisme exact de son effet reste encore inconnu.

Ces effets protecteurs sont probablement dus à la présence de composés phénoliques qui sous leurs nombreuses formes sont les principaux composants responsables des propriétés fonctionnelles de nombreux aliments, comme les capacités antioxydantes et anti-inflammatoires (Kerem et al., 2006; Wu et al., 2006; Almaraz-Abarca et al., 2007; Arzi et al., 2015). En effet, l'effet protecteur de la gelée royale a été étudié par Kaynar et al. (2012), qui

ont montré que l'administration orale de la gelée royale diminue les dommages intestinaux induits par le méthotrexate (un agent chimiothérapeutique).

Ces dernières années, de nombreux auteurs ont rapporté le rôle des antioxydants dans le phénomène de cicatrisation (Lee et al., 2012; Deniz et al., 2013).

D'autre part, Nagai et al. (2001) ont notamment testé le pouvoir antioxydant de la gelée royale par détermination de la production de l'anion superoxyde. Ils ont montré que la gelée royale a un pouvoir antioxydant qui augmente avec sa concentration. Ces propriétés antioxydantes de la gelée royale sont moins puissantes que celles de la propolis mais sont plus actives que n'importe quel miel.

Conclusion

Conclusion

La première partie de ce travail consiste à étudier les paramètres physicochimiques de la gelée royale algérienne.

L'expérimentation est menée sur deux sortes de la gelée royale d'origine différente, l'une récoltée dans la région de Blida et l'autre en provenance de la région de Boumerdès. Pour les deux échantillons, nous avons étudié les paramètres physicochimiques.

Au cours de ces analyses, nous avons remarqué que la composition physico-chimique de la gelée royale algérienne est comparable à celle des échantillons de gelée royale produits dans d'autres pays.

La seconde partie de ce manuscrit est axée sur l'effet immunomodulateur de la gelée royale sur le développement d'une réponse immune systémique et anaphylactique intestinale chez les souris Balb/c rendues allergiques cette approche a été effectuée à partir d'un modèle animal de sensibilisation expérimentale aux protéines de lait du vache.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

L'administration orale de la gelée royale chez les souris immunisées à la β -lactoglobuline (β -Lg) induit:

- ✓ Une faible production des anticorps IgE totales, IgG et IgE anti β -Lg est obtenue chez les groupes de souris ayant reçu la gelée royale à 0,5g/kg, 1g/kg et 1,5g/kg pendant 7 jours et ensuite sensibilisés à la β -Lg comparée aux témoins positifs.
- ✓ Aucun signe clinique ou baisse de la température corporelle ne sont observés chez les souris ayant reçu la gelée royale à différentes doses. Ces mêmes groupes de souris présentent un test cutané négatif.
- ✓ Une diminution significative du taux d'histamine plasmatique et de la perméabilité vasculaire chez tous les groupes de souris prétraitées à la gelée royale.
- ✓ Absence de réponse anaphylactique locale au niveau intestinale qui se traduit par des valeurs de l'Isc et de la conductance inchangées chez les souris prétraitées à la gelée royale à différentes doses.

Les résultats obtenus mettent en évidence que l'administration de la gelée royale peut diminuer l'hypersensibilité des souris vis-à-vis la β -Lg ainsi que leur réponse anaphylactique locale au niveau intestinal.

L'étude histologique de la muqueuse intestinale a révélé que:

L'administration de la gelée royale a réduit les altérations tissulaires de la muqueuse intestinale et le nombre élevé des mastocytes induits par l'immunisation par la β -Lg.

Ces résultats suggèrent que la gelée royale peut avoir un effet bénéfique sur l'allergie aux protéines de lait de vache en réduisant ses symptômes.

En perspectives, il est intéressant de doser des cytokines de type Th2/Th1, les protéases mastocytaires de type 1 (MCP 1) et les marqueurs d'acquisition de la tolérance orale comme les cellules T régulatrices, le TGF β et l'IL10.

✓ Une étude plus approfondie est nécessaire pour l'identification des protéines et lipides de la gelée royale par l'utilisation des techniques telles que MALDI TOF/TOF MS et la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

✓ Il est intéressant également d'effectuer des analyses physico-chimiques de la gelée royale dans toutes les régions de notre pays, afin d'établir des normes nationales pour les utiliser dans les domaines pharmaceutique et cosmétique.

Références Bibliographiques

- Adam F.** Les croisements et l'apiculture de demain. Paris: SNA, 1985; 127p.
- Abdelatif M., Yakoot M., Etmaan M.** Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *Journal of Wound Care*, 2008; 17: 108-110.
- Addou S, Brahim AC, Mouhali K, Elgebaly HA, Mosa NM, Kheroua O, Saidi D.** Soy proteins and cross-reactivity. *International Journal of Scientific Research in Knowledge*, 2016; 4: 001-008.
- Addou S, Tomé D, Kheroua O, Saidi D.** Parenteral immunization to β -lactoglobulin modifies the intestinal structure and mucosal electrical parameters in rabbit. *International Immunopharmacology*, 2004; 4: 1559-1563.
- Adel-Patient K.** Allergies alimentaires: mécanismes, biomarqueurs et impact de différents facteurs environnementaux. *Innovations Agronomiques*, 2016; 52: 1-14.
- Adel-Patient K, Nahori MA, Proust B, Lapa E, Silva JR, Creminon C, Wal JM, Vargaftig BB.** 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; 33: 376-385.
- Adel-Patient K, Wavrin S, Bernard H, Meziti N, Ah-Leung S, Wal JM.** Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine β -lactoglobulin. *Allergy*, 2011; 66: 1312–1321.
- Adjlane N, Doumandji SE, Haddad N.** Situation de l'apiculture en Algérie: facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. *Cahiers Agricultures*, 2012; 21: 235-41.
- Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis J, Rieu D, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Dominique T.** Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006; 42: 352–361.
- Ahrens R, Osterfeld H, Wu D, Chen CY, Arumugam M, Groschwitz K, Strait R, Wang YH, Finkelman FD, Hogan SP.** Intestinal mast cell levels control severity of oral antigen-induced anaphylaxis in mice. *Am J Pathol*, 2012; 180: 1535-1546.
- Aissa K, Ben Ameer S, Kamoun F, Feki S, Kmiha S, Aloulou H, Masmoudi H, Chabchoub I, Hachicha M.** Allergie aux protéines du lait de vache: histoire naturelle et facteurs de persistance. *Revue française d'allergologie*, 2017; 57: 18-23.

- Ait Soura et Mecellem.** Étude comparative des paramètres physico- chimiques et propriétés antioxydantes des produits de la ruche: gelée royale, miel, pollen, propolis et cire d'abeille. Mémoire de Fin de Master. Université A. MIRA-Bejaia, 2017; 69p.
- Albert S, Klaudiny J.** The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology*, 2004; 50, 51–59.
- Ali MAM.** Factors affecting royal jelly production. M.sc. Thesis, Faculty of Agriculture, in Shams University, Cairo, Egypt, 1994; 161p.
- Ali MAM.** Relationship Between Number of Grafted Queen Cell Cups and Amount of Produced Royal Jelly in Honey Bee Colonies *Apis mellifera* L. *Egypt Acad J Biolog Sci*, 2017; 10: 65-70.
- Almaraz-Abarca N, da Graça Campos M, Avila-Reyes JA, Naranjo-Jimenez N, Herrera Corral J, Gonzalez-Valdez LS.** Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compost Anal*, 2007; 20: 119-124.
- Alphandery R.** La route du miel: Le Grand Livre des Abeilles et de L'Apiculture. Paris: Nathan, 2002; 288p.
- Amigou M.** Les résidus de médicaments vétérinaires et de pesticides dans les produits apicoles alimentaires (miel, pollen, gelée royale et propolis). Thèse de Doctorat Vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 2016; 32-45.
- Andre F.** Les sensibilisations les plus fréquentes chez 500 porteurs d'allergies alimentaires. *Rev Fr Allergol*, 1992; 32: 11-15.
- AOAC.** Official method of analysis of the association official analytical chemists. In: W. Horwitz (13th ed). Association of the Official Analytical Chemists. Washington, C, USA, 1980; 14-15.
- Apimondia-standing commission of apitherapy.** Traité d'Apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom] v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SARL Brussels, 2001; ISBN : 2- 9600270-0-0.
- Arzi A, Houshmand GH, Goudarzi M, Khadem Haghghian H, Rashidi Nooshabadi MR.** Comparison of the Analgesic Effects of Royal Jelly with Morphine and Aspirin in Rats Using the Formalin Test. *J Babol Univ Med Sci*, 2015; 17: 50-56.

- Ashley S, Dang T, Koplin J, Martino D, Prescott S.** Food for thought: progress in understanding the causes and mechanisms of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015; 15: 237-242.
- Audigie CL, Fagerella J, Zonszain F.** Manipulation d analyse biochimique. Edition Tec & Doc. Paris: Lavoisier, 1984; 270p.
- Baek JI, ShinYH, Chung I H, Kim H J, Yoo EG, Yoon JW, Jee HM, Chang YE, Han MY.** The Link between serum vitamin D level, sensitization to food allergens, and the severity of atopic dermatitis in infancy. *J Pediatr*, 2014; 165: 849-854.
- Baek F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C.** Vitamin D: Modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*, 2010; 10: 482-496.
- Bain CC, Mowat AM.** Intestinal macrophages-specialised adaptation to a unique environment. *Eur J Immunol*, 2011; 41: 2494-2498.
- Balkanska R, Karadjova I, Ignatova M.** Comparative analyses of chemical composition of royal jelly and drone brood. *Bulg Chem Commun*, 2014; 46: 412-416.
- Ballmer-Weber BK, Fernandez-Rivas M, Beyer K, Defernez M, Sperrin M, Mackie AR, Salt LJ, Hourihane JO, Asero R, Belohlavkova S, Kowalski M, de Blay F, Papadopoulos NG, Clausen M, Knulst AC, Roberts G, Popov T, Sprickelman AB, Dubakiene R, Vieths S, van Ree R, Crevel R, Mills EN.** How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2015;135:964-971.
- Ballot Flurin C.** Miels et gelée royale: leur origine, leur nature, leur composition et leurs propriétés reconnues. *Phytothérapie*, 2009; 7: 87-90.
- Barker SA, Foster AB, Lamb CD, Hodgson N.** Identification of 10-hydroxy-D2-decenoic acid in royal jelly. *Nature*, 1959; 183: 996-997.
- Bărnuliu LI, Mărghitaş LA, Dezmiorean DS, Bobiş O, Mihai CM, Pavel C.** Antimicrobial compounds of royal jelly. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2011; 68: 85-90.
- Benaissa Y, Addou S, Dib W, Kheroua O, Saidi D.** Coconut milk modulate the antigenicity of alpha-lactalbumin in balb/c mice. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2018; 9: 290-293.

- Benhamou AH, Caubet J-C, Eigenmann PA, Nowak-Wegrzyn A, Marcos CP, Reche M, Urisu A.** State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy*, 2010; 65: 283-9.
- Berni Canani R, Gilbert JA, Nagler CR.** The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2015; 15: 243-9.
- Bidat E.** L'allergie aux protéines du lait de vache: nouveautés. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2011; 24: 105-108.
- Bidat E.** Allergie alimentaire de l'enfant Food. *Archives de pédiatrie*, 2006; 13: 1349-1353.
- Blanc M.** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse Doctorat d'Etat en Pharmacie. Université de Limoges, 2010; 144p.
- Blank U, David B.** Agrégation des récepteurs à IgE et activation membranaire. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*, 1998; 38: 878-885.
- Blanka U, Vitte J.** Les médiateurs du mastocyte. *Revue française d'allergologie*, 2014; 55: 31-38.
- Blázquez AB, Berin MC.** Microbiome and Food Allergy. *Transl Res*. 2017; 179: 199-203.
- Bobis O, Marghitas IA, Dezmirean D, Morar O, Bonta V, Chirila F.** Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2010; 67: 91-96.
- Bogdanov S.** Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health, Medicine: A Review. *Lipids*, 2011; 3: 8-19.
- Bonvehí serra J.** Azucares, acidez y pH de la jalea real. *An Bromatol*, 1992; 44: 65-69.
- Boselli E, Caboni MF, Sabatini AG, Marcazzan GL, Lercker G.** Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*, 2003; 34: 129-137.
- Boughellout H, Benatallah L, Zidoune MN.** Prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache chez des enfants âgés de moins de 3 ans de la ville de Constantine (Algérie). *Revue française d'allergologie*, 2015; 55: 288-292.
- Boukraa L.** Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Altern Med Rev*, 2008; 13: 330-333.

- Boukraa L.** Additive action of royal jelly and honey against *Staphylococcus aureus*. *J Med Food*, 2008; 11: 190-2.
- Brandtzaeg P.** Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev*, 1998; 56: 5-18.
- Broekman HCH, Eiwegger T, Upton J, Bøgh K L.** IgE - the main player of food allergy. *Drug Discov Today: Dis Model*, 2015; 17-18: 37-44.
- Buttel-Reepen HV.** Apistica Beitragezur Systematik, Biologie, sowie zurgeschichtlichenund geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifera L.*), ihrer Varietaten und der ilbrigen Apis-Arten. *MitteilWigen aus dem ZoologischenMuseum im Berlin*, 1906; 3: 121-196.
- Dupont C, Soulaines P, Lapillonne A, Donne N, Kalach N, Benhamou P.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2010; 50: 463-464.
- Cao LF, Zheng HQ, Pirk CW, Hu FL, Xu ZW.** High Royal Jelly-Producing Honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China. *Journal of Economic Entomology*, 2016; 109: 510-4.
- Capobianco F, Butteroni C, Barletta B, Corinti S, Afferni C, Tinghino R, Boirivant M, Di Felice, G.** Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions. *Int Immunol*, 2008; 20: 1077-1086.
- Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, Sparwasser T, Snapper SB, Weiner HL, Mora JR.** Gut-tropic T cells that express integrin alpha4beta7 and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology*, 2011; 141: 2109-18.
- Castro GA, Harari Y, Russell DA.** Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. *Am J Physiol*, 1987; 253: 540-8.
- Chandrashekhhar VM, Halagali KS, Nidavani RB, Shalavadi MH, Biradar BS, Biswas D, Muchchandi IS.** Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita L.*) in mast cell mediated allergy mode. *J Ethnopharmacol*, 2011; 137: 336-340.
- Chehade M, Mayer L.** Oral tolerance and its relation to food hyper-sensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115: 3-13.
- Chen C, Chen SY.** Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry*, 1995; 54: 195-200.

Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, time point and sex. *Food and Chemical Toxicology*, 2013; 62: 41-47.

Chen CN, Hsiao CJ, Lee SS, Guh JH, Chiang PC, Huang CC, Huang WJ. Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Natural product research*, 2012; 26: 116-124.

Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J Allergy Clin Immunol*, 2016; 137: 984-997.

Chiu HF, Chen BK, Lu YY, Han YC, Shen YC, Venkatakrishnan K, Golovinskaia O, Wang CK. Hypocholesterolemic efficacy of royal jelly in healthy mild hypercholesterolemic adults. *Pharmaceutical Biology*, 2017; 55: 497-502.

Commission Brésilienne. Instruction normative N°11. Publié au Journal officiel de 23/10/00. Section I, 2000; 16-17.

Crow SE, Soda K, Stanisz AM, Perdue MH. Intestinal permeability in allergic rats. Nerve involvement in antigen induced changes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1994; 27: G617-G623.

Crowe SE, Sestini P, Perdue HM. Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport response to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology*, 1990; 99: 74-82.

Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol*, 2006; 25: 49-62.

Dearman RJK. Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose response analyses. *Clin Exp Allergy*, 2003; 33: 1586-94.

DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW. Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127: 1211-1218.

Denis M, Loras-Duclaux I, Lachaux A. Sensibilisation et allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant allaité. *Archives de Pédiatrie*, 2012; 19: 305-312.

Deniz M, Borman H, Seyhan T, Haberal M. An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-acetylcysteine. *Burns*, 2013; 39: 320-325.

Desjeux JF, Heyman M. Milk protein, cytokines and intestinal epithelial function in children. *Acta paediatr Jpn*, 1994; 36: 592-6.

- Dib W, Chekroun A, El Ghaish S, Choiset Y, Chobert JM, Haertlé T, Saïdi D, Kheroua O.** Protecting effect of *Enterococcus faecium* on intestinal epithelial structure in Balb/c mice immunized via intra-peritoneal way by β -lactoglobulin. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2014; 6: 587-590.
- Domerego R.** Chapitre X : Santé, bien-être, apithérapie in Clément H. et al. *Le Traité Rustica de l'apiculture* Editions Rustica. Paris, 2009: 390-417.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R.** Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010; 107: 11971-5.
- Donadieu Y.** *La gelée royale thérapeutique naturelle*. 5^e Edition. Paris: Maloine, 1981; 79p.
- Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R.** Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res*, 2006; 16: 1385-1394.
- Dupont C, Soulaines P.** Actualités thérapeutiques dans la prise en charge nutritionnelle de l'allergie aux protéines de lait de vache. *Archives de Pédiatrie*, 2017; 24: 1350-1357.
- Dupont C, Kalach N, Soulaines P, Legoué-Morillon S, Piloquet H, Benhamou PH.** Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125: 1165-1167.
- Dutau G, Rancé F.** Histoire de l'allergie alimentaire: des précurseurs à l'histoire contemporaine, 2006; 46: 312-323.
- Dutau G, Rancé F.** Facteurs de risque de l'allergie alimentaire sévère. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 2007; 47: 102-109.
- Dutau G.** Epidémiologie des allergies alimentaires. *Revue Française d'Allergologie et d'immunologie clinique*, 2003; 43: 501-506.
- El-Agamy EI.** The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 2007; 68: 64-72.
- El Mecherfi KE, Rouaud O, Curet S, Negaoui H, Chobert JM, Kheroua O, Saïdi D, Haertlé T.** Peptic hydrolysis of bovine beta-lactoglobulin under microwave treatment reduces its allergenicity in an ex vivo murine allergy model. *Int J Food Sci Technol*, 2014; 50: 356-364.

- El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA.** Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*, 2007; 50: 256-269.
- Ezri J, Roethlisberger S, Bianchi N, Tempia-Caliera Schäppi M, Wassenberg J, Angelini F.** Recommendations pour la prise en charge du nourrisson avec allergie aux protéines du lait de vache. *Paediatrica*, 2016; 27: 24-28.
- Fang Y, Feng M, Li JK.** Royal jelly proteome comparison between *A. Mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *Journal of Proteome Research*, 2010; 9: 2207-2215.
- Farache J, Koren I, Milo I, Gurevich I, Kim KW, Zigmond E, Furtado GC, Lira SA, Shakhar G.** *Immunity*, 2013; 38: 581-595.
- Feiterna-Sperling C, Rammes S, Kewitz G, Versmold H, Niggemann BA.** Case of cow's milk allergy in the neonatal period-evidence for intrauterine sensitization. *Pediatr Allergy Immunol*, 1997; 8: 153-155.
- Ferioli F, Marcazzan GL, Caboni MF.** Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 2007; 30: 1061-1069.
- Ferioli F, Armaforte E, Caboni MF.** Comparison of the lipid content, fatty acid profile and sterol composition in local Italian and commercial royal jelly samples. *J Am Oil Chem Soc*, 2014; 91: 875-884.
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzmán MA, Li H, Heine RG, 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. *Pediatr Allergy Immunol*, 2010; 21:1-125.
- Fiorani M, Accorsi A, Blasa M, Diamantini G, Piatti E.** Flavonoids from Italian multi-floral honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J Agric Food Chem*, 2006; 54: 8328-8334.
- Flinterman AE, Knulst AC, Meijer Y, Bruijnzeel-Koomen CA, Pasmans SG.** Acute allergic reactions in children with AEDS after prolonged cow's milk elimination diets. *Allergy*, 2006; 61: 370-374.

- Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, Cesar LM, Malaspina O.** Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 2004; 25: 919-928.
- Fox PF, McSweeney PLH.** Dairy chemistry and biochemistry. London, New York: Blackie Academic & Professional, 1998; 478p.
- Fratini F, Cilia G, Mancini S, Felicioli A.** Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol Res*, 2016; 192: 130-141.
- Fritsche R.** Role for technology in dairy allergy. *Aust J Dairy Technol*, 2003; 58: 89-91.
- Frossard CP, Hauser C, Eigenmann PA.** Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114: 377-82.
- Frossard P, Tropa 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.
- Fujii M, Yonekura M, Higuchi T, Morimitsu K, Yoshino I, Mukai S, Aoki T, Fukunaga T, Inoue Y, Sato M, Kanaeda J.** Effect of 350 kDa Glycoprotein in Royal Jelly on Primary Culture of Rat Hepatocytes. *Food Science and Technology International*, Tokyo, 1996; 2: 223-225.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H.** Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 2013; 504: 446-50.
- Garcia-Amoedo LH, Almeida-Muradian LB.** Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Quimica Nova*, 2007; 30: 257-259.
- Garnier L, Bienvenu J, Lombard C, Bienvenu F, Viel S.** Les prédispositions génétiques dans l'allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie*, 2017; 57: 222-224.
- Gasic S, Vucevic D, Vasilijic S, Antunovic M, Chinou I, Colic M.** Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2007; 29: 521-536.

- Georgiev DB, Metka M, Huber JC, Goudev AR, Manassiev N.** Effects of an herbal medication containing bee products on menopausal symptoms and cardiovascular risk markers: results of a pilot open-uncontrolled trial. *MedGenMed.* 2004; 16; 6:46.
- Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M.** Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. *Int J Reprod Biomed (Yazd),* 2016a; 14:519-526.
- Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M.** Improvement in serum biochemical alterations and oxidative stress of liver and pancreas following use of royal jelly in streptozotocin induced diabetic rats. *Cell J,* 2016b; 18: 362-370.
- Gharbi M.** Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition - Propriétés thérapeutiques. Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse Méd Vét. Université Claude Bernard, Lyon, 2011; 247p.
- Gilfillan AM, Beaven MA.** Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol,* 2011; 31: 475-529.
- Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, Trinchieri G, Kaiserlian D.** Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity,* 2008; 29: 464-475.
- Grar H, Dib W, El Mecherfi KE, Negaoui H, Gourine H, Benattia Bekkaddour S, Amier L, Kaddouri H, Kheroua O, Saidi D.** Supplementation with b-carotene or vitamin E protects against increase in anaphylactic response in β -lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: *ex vivo* study. *Eur Food Res Technol,* 2015; 241: 393-398.
- Gumbiner B.** Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol,* 1987; 253: 749-758.
- Guo BH.** Dairy chemistry. Beijing: China Light Industry Press, 2001; 2-4.
- Haddi A, Guendouz M, Ainad Tabet S, Mehedi N, Kheroua O, Saidi D.** Polyunsaturated fatty acids affect intestinal anaphylactic response in BALB/c mice sensitized with β -lactoglobulin. *Revue française d'allergologie,* 2018; 58: 437-443.
- Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, Müller W, Sparwasser T, Förster R, Pabst O.** Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity,* 2011; 34: 237-46.

- Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C.** Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, 1993; 55: 498-505.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ.** Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008; 27: 104-19.
- Han B, Li C, Zhang L, Fang Y, Feng M, Li J.** Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011; 59, 10346-10355.
- Hennino A, Bérard F, Guillot I, Saad N, Rozières A, Nicolas J-F.** Pathophysiology of urticaria. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2006; 30: 3-11.
- Heyman M, Ducro R, Desjeux JF, Morgat JL.** Horseradish peroxydase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am J Physiol*, 1982; 242: 558-948.
- Hould R.** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Paris, Montréal, Maloine Décarie, 1984: 147-156.
- Huang CH, Shen CC, Liang YC, Jan TR.** The probiotic activity of *Lactobacillus murinus* against food allergy. *Journal of Functional Foods*, 2016; 25: 231-241.
- Huang CH, Lin YC, Jan TR.** *Lactobacillus reuteri* induces intestinal immune tolerance against food allergy in mice. *J Funct Foods*, 2017; 31: 44-51.
- Huang CY, Chi LL, Huang WJ, Chen YW, Chen WJ, Kuo YC, Yuan CM, Chen CN.** Growth stimulating effect on queen bee larvae of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012; 60: 6139-6149.
- Huang Q, Xu H, Yu Z, Gao P, Liu S.** Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig model for soybean glycinin and beta-conglycinin allergy. *J Agric Food Chem*, 2010; 58: 5194-5198.
- Hussein MH.** L'apiculture en Afrique (les pays du nord, de l'est, du nord et de l'ouest du continent). *Apiacta*, 2001; 1: 32-48.
- Ibsaine O, Djenouhat K, Lemdjadani N, Berrah H.** Incidence de l'allergie aux protéines du lait de vache IgE-médiée au cours de la première année de vie. *Nutrition santé*, 2013; 2: 9-16.

- Isolauro E, Sampson HA.** Use of an amino acid-based formula in the management of cow's milk allergy and multiple food protein intolerance in children. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113:154.
- Isolauro E, Sütas Y, Salo MK, Isosomppi R, Kaila M.** Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in young children. *J Pediatrics*, 1998; 132: 1004-9.
- Ivanov T, Mitev B.** Study on the composition and physico-chemical properties of royal jelly. *ZhiVot Nauki*, 1981; 17: 89- 95.
- Iweala OI, Choudhary SK, Commins SP.** Food Allergy. *Current gastroenterology reports*, 2018; 20: 17.
- Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H.** 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2009; 6: 489-494.
- Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, Berg PL, Davidsson T, Powrie F, Johansson-Lindbom B, Agace WW.** Small intestinal CD1031 dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med*, 2008; 205: 2139-49.
- Jalonen T.** Identical intestinal permeability changes in children with different clinical manifestations of cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 1991; 88: 737-742.
- Jensen-Jarolim E, Wiedermann U, Ganglberger E, Zurcher A, Stadler BM, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Breiteneder H.** Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB Journal*, 1999; 13: 1586-1592.
- Jianke L, Shenglu C, Boxiong Z, Su SK.** The optimal way of royal jelly production. *American Bee Journal*, 2003; 143: 221-223.
- Jones SM, Burks W, Dupont C.** State of the art on food allergen immunotherapy: Oral, sublingual, and epicutaneous Stacie. *J Allergy Clin Immunol*, 2014; 133: 318-323.
- Just J, Deschildre A, Beaudouin E.** Allergies alimentaires: Nouveaux concepts, affections actuelles, perspectives thérapeutiques. Elsevier Health Sciences, 2017; 324p.
- Kalach N, Rocchiccioli F, de Boissieu D, Benhamou PH, Dupont C.** Intestinal permeability in children: variation with age and reliability in the diagnosis of cow's milk allergy. *Acta Pediatr*, 2001; 90: 499-504.

- Kalesnikoff J, Galli SJ.** New developments in mast cell biology. *Natural Immunology*, 2008; 9: 1215-1223.
- Kanelis D, Tananaki C, Liolios V, Dimou M, Goras G, Rodopoulou MA, Karazafiris E, Thrasyvoulou A.** “A suggestion for royal jelly specifications”. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2015; 66: 275-284.
- Kanny G.** Food allergy. *Revue Praticien*, 2007; 57:1331-8.
- Karaali A, Meydanogu F, Eke D.** Studies on composition, freeze drying and storage of Turkish royal jelly. *J Apic Res*, 1988; 27: 182-185.
- Karaca T, Bayiroglu F, Yoruk M, Kaya MS, Uslu S, Comba B, Mis L.** Effect of royal jelly on experimental Colitis induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats. *Eur J Histochem*, 2010; 54: e35.
- Kashima Y, Kanematsu S, Asai S, Kusada M, Watanabe S, Kawashima T, Nagaoka S.** Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. *PLoS One*, 2014; 9: e105073.
- Kataoka M, Arai N, Taniguchi Y, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Analysis of antiallergic function of royal jelly. *Natural Med*, 2001; 55: 174-180.
- Katz Y, Rajuan N, Goldberg MR, Eisenberg E, Heyman E, Cohen A, Leshno M.** Early exposure to cow’s milk protein is protective against IgE-mediated cow’s milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 126: 77-82.
- Kaynar L, Cetin A, Hacıoglu S, Eser B, Koçyigit I, Canöz O, Tasdemir A, Karadag C, Kurnaz F, Saraymen R, Silici S.** Efficacy of royal jelly on methotrexate-induced systemic oxidative stress and damage to small intestine in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012; 9: 412-417.
- Keet C, Frischmeyer-Guerrero P, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, Steele P, Driggers S, Burks W, Wood R.** The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012; 129: 448-455.
- Keil T, Lau S, Roll S, Grüber C, Nickel R, Niggemann B, Wahn U, Willich SN, Kulig M.** Maternal smoking increases risk of allergic sensitization and wheezing only in children with allergic predisposition: longitudinal analysis from birth to 10 years. *Allergy*, 2009; 64:445-45.

- Kelleher MM, Dunn-Galvin A, Gray C, Murray DM, Kiely M, Kenny L, McLean WHI, Irvine AD, Hourihane JO.** Skin barrier impairment at birth predicts food allergy at 2 years of age. *J Allergy Clin Immunol*, 2016; 137: 1111-6.
- Kerem Z, Chetrit D, Shoseyov O, Regev-Shoshani G.** Protection of lipids from oxidation by epicatechin, trans-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *J Agric Food Chem*, 2006; 54: 10288-10293.
- Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E.** New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review, 2018; 15: 757-775.
- Kheroua O.** Action anti-cholérique et passage transépithélial dans l'intestin de caséines natives et modifiées par le formaldéhyde. Thèse de Doctorat d'Etat es-Science, Université d'Oran, 1987; 161p.
- Kilshaw PJ, Cant A.** The passage of maternal dietary proteins in human breast milk. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1984; 75: 8-15.
- Kim EH, Burks W.** Immunological basis of food allergy (IgE mediated, non-IgE-mediated, and tolerance). *Chem Immunol Allergy*, 2015; 101: 8-17.
- Kim TH, Yoon H J, Lim CM, Kim EK, Kim MJ, Koh Y.** The role of endogenous histamine on the pathogenesis of the lipopolysaccharide (LPS)-induced, acute lung injury: A pilot study. *Inflammation*, 2005; 29: 72-80.
- Kimura Y, Washino N, Yonekura M.** N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995; 59: 507-509.
- Kirk RE, Othmer DF.** Encyclopedia of chemical technology. New York: John Wiley and sons, 1994; 11: 929-947.
- Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M.** Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004; 68: 138-145.
- Kolayli S, Sahin H, Can Z, Yildiz O, Malkoc M, Asadov A.** A member of complementary medicinal food: anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2016; 21: 43-48.

- Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Staiano A, Schäppi MG, Vandenplas Y.** Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012; 55: 221-229.
- Kulig M, Luck W, Wahn U.** The association between pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first 3 years of life. *Allergy*, 1999; 54: 220-8.
- Kumar D, Kumar S, Verma AK, Sharma A, Tripathi A, Chaudhari BP, Kant S, Das M, Jain SK, Jain SK, Dwivedi PD.** Hypersensitivity linked to exposure of broad bean protein(s) in allergic patients and BALB/c mice. *Nutrition*, 2014; 30: 903-14.
- Kumar S, Verma AK, Das M, Dwivedi PD.** Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immunopharmacology*, 2012; 13: 432-439.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
- Lannero E, Wickman M, van Hage M, Bergstrom A, Pershagen G, Nordvall L.** Exposure to environmental tobacco smoke and sensitisation in children. *Thorax*, 2008; 63: 172-176.
- Lee YH, Chang JJ, Chien CT, Yang MC, Chien HF.** Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res*, 2012; 2012: 11.
- Lercker G, Caboni MF, Vecchi MA, Sabtini AG, Nanetti A, Piana L.** Composizione della frazione glucidica della gelatina reale e della gelatina delle api operaie in relazione all'età larvale. *Apicoltura*, 1985; 1: 123-139.
- Lercker G, Savioli S, Vecchi MA, Sabtini AG, Nanetti A, Piana L.** Carbohydrate determination of royal jelly by high resolution gas chromatography (HRGC). *Food Chemistry*, 1986; 19: 255-264.
- Lercker G.** La gelatina reale: Composizione, autenticità ed adulterazione. In *Atti del Convegno "Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell'alveare"*. Università degli Studi del Molise; Campobasso, 2003: 67-81.
- Levine S, Saltzman A.** Distribution of small intestine lesions in anaphylaxis of rat. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998; 115: 312-315.

- Levy MB, Elizur A, Goldberg MR, Nachshon L, Katz Y.** Clinical predictors for favourable outcomes in an oral immunotherapy program for IgE-mediated cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014; 112: 58-63.
- Li J, Wang T, Zhang Z, Pan Y.** Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55: 8411-8422.
- Li JK, Feng M, Zhang L, Zhang ZH, Pan YH.** Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *J Proteome Res*, 2008; 7: 3339-3353.
- Li XM, Huang CK, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Kim KH, Huang SK, Sampson HA.** Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. *J Immunol*, 1999a; 162: 3045-3052.
- Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GA, Sampson HA.** A murine model of IgE mediated cow milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 1999b; 103: 206-14.
- Lian-Fei Cao, Huo-Qing Zheng, Christian W. W. Pirk, Fu-Liang Hu, and Zi-Wei Xu.** High Royal Jelly-Producing Honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China. *Journal of Economic Entomology*, 2016; 109: 510-4.
- Lifrani A, Dubarry M, Rautureau M, Aattouri N, Boyaka PN, Tome D.** Peanut lupine antibody cross-reactivity is not associated to cross-allergenicity in peanut-sensitized mouse strains. *International Immunopharmacology*, 2005; 5: 1427-1435.
- Liu JR, Yang YC, Shi LS, Peng CC.** Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J Agric Food Chem*, 2008; 56: 11447-11452.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 193-251.
- Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A.** Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*, 2013; 6: 666-77.
- Macdougall CF, Cant AJ, Colver AF.** How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Arch Dis Child*, 2002; 86: 236-9.

- Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Presses polytechniques et universitaires romandes, 2005; 93p.
- Macpherson AJ, Uhr T.** Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 2004; 303: 1662-5.
- Magnan A, Vervloet D.** Allergies: determinants of T2 lymphocyte polarization and desensitization mechanisms. *Rev Mal Respir*, 1997; 14: 173-181.
- Majamaa H, Isolauri E.** Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*, 1996; 97: 985-990.
- Majtan J, Kovacova E, Bilikova K, Simuth J.** The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1major honeybee royal jelly protein-on TNF alpha release. *International Immunopharmacology*, 2006; 6: 269-278.
- Marcon-Genty D, Tomé D, Kheroua O, Dumontier AM, Heyman M, Desjeux JF.** Transport of β -lactoglobulin across rabbit ileum in vitro. *Am J Physiol*, 1989; 256: 943-948.
- Mărgăoan R, Marghitas LA, Dezmirean DS, Bobis O, Bonta V, Catana C, Urcan A, Muresan CI, Margin MG.** Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2017; 74: 51-58.
- Mărghitaș LA, Morar O, Bobiș O, Bonta V, Dezmirean DS.** Comparative evaluation of chemical composition for three categories of royal jelly. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2010; 16: 399-401.
- Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 2002; 51: 304-315.
- Martini MC, Seiller M.** Actifs et additifs en cosmétologie. 3^{ème} édition. Paris: Editions Tec & Doc; Cachan: Éditions Médicales Internationales, 2006; XXVIII-1051p.
- Martino D, Joo JE, Sexton-Oates A, Dang T, Allen K, Saffery R, Prescott S.** Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. *Epigenetics*, 2014; 9: 998-1006.

- Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, Chieppa M, Rescigno M.** Gut CD1031 dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*, 2010; 59: 595-604.
- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ.** Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 2012; 483: 345-9.
- Melliou E, Chinou I.** Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 8987-8992.
- Melliou E, Chinou I.** Chemistry and Bioactivities of Royal Jelly. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, 2014; 43: 261-290.
- Messia MC, Caboni M F, Marconi E.** Valutazione della freschezza della gelatina reale. In *Atti del Convegno "Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell'alveare"*. Università degli Studi del Molise - Campobasso, 2003; 83-92.
- Messia MC, Caboni MF, Marconi E.** Storage stability assesment of freeze dried RJ by furosine de-termination. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 4440-4443.
- Mestecky J, McGhee JR.** Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol*, 1987; 40: 153-245.
- Metry WA, Owayss AA.** Influence of Incorporating Honey and Royal Jelly on The Quality of Yoghurt During Storage. *Egypt J Food Sci*, 2009; 37: 115-131.
- Millet J.** Matières premières produites par l'abeille. In *Martini MC, Seiller M. Actifs et additifs en cosmétologie*, 3ème édition, Lavoisier, Paris, 2006; 335-363.
- Moazed B, Hiebert LM.** An in vitro study with an ussing chamber showing that unfractionated heparin crosses rat gastric mucosa. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007; 322: 299-305.
- Molkhou P.** La dermatite atopique (DA) et l'allergie alimentaire (AA) en 2008. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2009; 22: 5-13.
- Moneret-Vautrin DA, Hatahet R, Kanny G.** Hydrolysats de protéines : laits hypoallergéniques et formules extensivement hydrolysées. Bases immuno allergologiques de leur utilisation dans la prévention et le traitement de l'allergie au lait. *Archives de Pédiatrie*, 2001; 8: 1348-57.

- Moneret-Vautrin DA.** Immunothérapie sublinguale et orale de l'allergie alimentaire: effets cliniques et signification des modifications immunologiques. *Rev Fr Allergol*, 2011; 51: 286-294.
- Moneret-Vautrin DA.** Traitement des allergies alimentaires par protocoles d'induction de tolérance orale. Sont-ils applicables au cas de l'allergie à l'arachide? *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 2008; 48: 20-25.
- Mousallem T, Burks AW.** Immunology in the clinic review Series; focus on allergies: immunotherapy for food allergy. *Clin Exp Immunol*, 2012; 167: 26-31.
- Mullins RJ.** Paediatric food allergy trends in a community-based specialist allergy practice, 1995–2006. *Med J Aust*, 2007; 186: 618-21.
- Münstedt K, Von Georgi R.** Royal jelly - a miraculous product from the bee hive. *American Bee Journal*, 2003; 43: 647-650.
- Muraro A, Roberts G, Worm M, Bilo MB, Brockow K, Fernandez Rivas M, Santos AF, Zolkipli ZQ, Bellou A, Beyer K, Bindslev-Jensen C, Cardona V, Clark AT, Demoly P, Dubois AE, DunnGalvin A, Eigenmann P, Halken S, Harada L, Lack L, Jutel M, Niggemann B, Ruëff F, Timmermans F, Vlieg-Boerstra BJ, Werfel T, Dhami S, Panesar S, Akdis CA, Sheikh A.** Anaphylaxie: lignes directrices de l'Académie européenne d'allergie et d'immunologie clinique. *Allergie*, 2014; 69: 1026-45.
- Mureşan IC, Mărghitaş AL, Dezmirean SD, Bobiş O, Bonta V, Zacharias I, Mărgăoan R, Paşca C.** Quality Parameters for commercialized Royal Jelly. *Bulletin UASVM Anim Sci Biotechn*, 2016; 73: 1-8.
- Nabas Z, Haddadin MSY, Haddadin J, Nazer I K.** Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Pol J Food Nutr Sci*, 2014; 64: 171-180.
- Nagai TR, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T.** Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *J Med Food*, 2006; 9: 363-367.
- Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N.** Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 2001; 75: 237-240.

- Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe HA, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, Kaminogawa S.** Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in Tcell receptor transgenic mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 117: 1125-1132.
- Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garoffo LP, Valentini, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A.** Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004; 48: 363-369.
- Negaoui H, El Mecherfi K E, Tadjer SA, Grar H, Kheroua O, Saidi D.** Bovine lactoferrin allergenicity as studied in murine model of allergy. *Food and Agricultural Immunology*, 2016; 27: 711-723.
- Negaoui H, Kaddouri H, Kheroua O, Saidi D.** A Model of Intestinal Anaphylaxis in Whey Sensitized Balb/c Mice. *Am J Immunol*, 2009; 5: 56-60.
- Negaoui H.** Etude du pouvoir allergisant de la Lactoferrine bovine chez la souris *Balb/c*. Thèse de doctorat en sciences. Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, 2016; 142p.
- Nemni A, Grimfeld A, Just J.** Allergie alimentaire chez l'enfant. Décision thérapeutique en médecine générale, 2006; 31: 2-7.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC.** CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005; 307: 254-8.
- Niggemann B, Beyer K.** Adrenaline autoinjectors in food allergy: In for a cent, in for a Euro ? *Pediatric Allergy and Immunology*, 2012; 23: 506-508.
- Nosbaum A, Augey F, Nicolas JF, Bérard F.** Physiopathologie de l'urticaire. *Ann. Dermatol. Vénérologie*, 2014; 141: 559-564.
- Noti M, Kim BS, Siracusa MC, Rak GD, Kubo M, Moghaddam AE, Sattentau QA, Comeau MR, Spergel JM, Artis D.** Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. *J Allergy Clin Immunol*, 2014; 133: 1390-1399.
- Novak N, Gros E, Bieber T, Hallam JP.** Human skin and oral mucosal dendritic cells as “good guys” and “bad guys” in allergic immune responses. *Clin Exp Immunol*, 2010;161: 28-33.

- Nowak-Wegrzyn A, Sampson HA.** Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127: 558-573.
- Nozaki R, Tamura S, Ito A, Moriyama T, Yamaguchi K, Kono T.** A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins. *Food Chemistry*, 2012; 134: 2332-2337.
- Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group.** Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2014; 69: 992-1007.
- Oka H, Emori Y, Kobayashi N, Hayashi Y, Nomoto K.** Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *Int Immunopharmacol*, 2001; 1: 521-532.
- Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M.** Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci*, 2003; 73: 2029-2045.
- Oršolić N, Knezević A, Sver L, Terzić S, Hackenberger BK, Basić I.** Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Vet Comp Oncol*, 2003; 14: 216-226.
- Osborne NJ, Koplin JJ, Martin PE, Gurrin LC, Lowe AJ, Matheson MC, Ponsonby AL, Wake M, Tang ML, Dharmage SC, Allen KJ, HealthNuts Investigators.** Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127: 668-76.
- Oseroff C, Sidney J, Vita R, Tripple V, McKinney DM, Southwood S, Brodie TM, Sallusto F, Grey H, Alam R, Broide D, Greenbaum JA, Kolla R, Peters B, Sette A.** Analysis of T cell responses to the major allergens from German cockroach: epitope specificity and relationship to IgE production. *J Immunol*, 2012; 189: 679-88.
- Pabst O, Mowat AM.** Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*, 2012; 5: 232-9.
- PAC/RAC.** Programme d'Aménagement Côtier (PAC) "Zone Côtière Algéroise". Rapport Final Intègre. Split: PAP/RAC, Alger, Algérie, 2006; 189p.
- Païdassi H, Acharya M, Zhang A, Mukhopadhyay S, Kwon M, Chow C, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A.** Preferential expression of integrin $\alpha\beta 8$ promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. *Gastroenterology*, 2011; 141: 1813-20.

- Paidassi H.** Cellules T régulatrices et tolérance orale: rôle de l'intégrine $\alpha\beta 8$ exprimée par les cellules dendritiques. *Revue Française d'Allergologie*, 2017; 57: 125-127.
- Palomares O.** The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2013; 23: 371-82.
- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH.** Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017; 2017: 1259510. doi: 10.1155/2017/1259510.
- Pavel CI, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Tomoş LI, Bonta V, Şapcaliu A, Buttstedt A.** Comparison between local and commercial royal jelly- use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2- decenoic acid as quality parameter. *Journal of Apicultural Research*, 2014; 53: 116-123.
- Perdue MH, Masson S, Wershil BK, Galli SJ.** Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 1991; 87: 687-693.
- Perez-Machado MA, Ashwood P, Thomson MA, Latcham F, Sim R, Walker-Smith JA, Murch SH.** Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur J Immunol*, 2003; 33: 2307-15.
- Perrier C, Thierry AC, Mercenier A, Corthésy B.** Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice. *Clin Exp Allergy*, 2010; 40: 153-62.
- Petrovsky N, Aguilar JC.** Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Special Feature: Immunological Adjuvants. *Immunol Cell Biology*, 2004; 82: 488-496.
- Ponce M, Diesner SC, Szepefalusi Z, Eiwegger T.** Markers of tolerance development to food allergens. *Allergy*, 2016; 71: 1393-404.
- Poonyachoti S, Brown DR.** Delta-opioid receptors inhibit neurogenic intestinal secretion evoked by mast cell degranulation and type I hypersensitivity. *J Neuroimmunol*, 2001; 112: 89-96.
- Popescu O, Mărghita LA, Dezmirean D.** A study about physicochemical composition of fresh and lyophilized royal jelly. *Lucrări stiinifice*, 2008a; 41: 328-32.
- Popescu O, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Oana Lelia M, Laura L.** A characterization about physical-chemical Composition of royal jelly. *Animal Science and Biotechnologies*, 2008b; 65: 244-248.

- Pourtallier J, Davico R, Rognone MC.** Les analyses dans le contrôle de pureté de la gelée royale. *Revue française d'apiculture*, 1987; 465: 46-48.
- Pourtallier J, Davico R, Rognone MC.** Les analyses and le contrôle de pureté de la gelée royale. *L'Abeille de France*, 1990; 753: 405-407.
- Pramil A, Rancé F.** Intérêt des prick-tests aux hydrolysats dans l'allergie IgE-dépendante aux protéines du lait de vache chez l'enfant. *Rev Fr Allergol*, 2011; 51: 531-4.
- Prioult G, Nagler-Anderson C.** Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev*, 2005; 206: 204-218.
- Ramadan MF, Al-Ghamdi A.** Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *J Funct Foods*, 2012; 4: 39-52.
- Rancé F.** L'allergie aux protéines du lait de vache: facteurs prédictifs de tolérance. *Pédiatrie Pratique*, 2004; 156: 1-5.
- Rancé F, Dutau G.** Epidémiologie. In: «Allergies Alimentaires». Paris: L'Expansion Scientifique Française Edit. et Institut UCB de l'Allergie, 2004; 7-20.
- Rancé F, Dutau G.** Epidimiologie des allergies alimentaires. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 2007; 10: 13-20.
- Rancé F, Dutau G.** Actualité sur l'exploration et la prise en charge de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *Revue française d'allergologie*, 2009; 49: S28-S33.
- Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H.** Prevalence and main characteristics of school children diagnosed with food allergies in France. *Clinical & Experimental Allergy*, 2005; 35: 167-72.
- Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ.** The pathophysiology of anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2017; 140: 335-348.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial mono- layers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2001; 2: 361-7.
- Ruiter B, Rozemuller EH, van Dijk AJ, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Tilanus MG, Knol EF, van Hoffen E.** Role of human leucocyte antigen DQ in the presentation of T cell epitopes in the major cow's milk allergen alphas1-casein. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007; 143: 119-26.

- Saarinen KM, Juntunen-Backman K, Järvenpää AL, Kuitunen P, Lope L, Renlund M, Siivola M, Savilahti E.** Supplementary feeding in maternity hospitals and the risk of cow's milk allergy: a prospective study of 6209 infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999; 104: 457-61.
- Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB.** Quality and standardisation of royal jelly. *JAAS*, 2009; 1: 1-6.
- Sabouraud-Leclerc D.** L'immunothérapie au cours de l'allergie alimentaire : l'état des lieux en 2013. *Revue française d'allergologie*, 2013; 53: 18-29.
- Saeed M, Kalhoro SA, Naveed M, Hassan FU, Umar M.** Prospects of royal jelly as a potential natural feed additive in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 2018; 74: 1-10.
- Sahinler N, Kaftanoğlu O.** Effects of Feeding Age of the Larvae and Queenlessness on the Production of Royal Jelly. *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Press. New York and London, 1997; 173-178.
- 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.
- 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.
- Salazar-Olivo LA, Paz-Gonzalez V.** Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Toxicology In Vitro*, 2005; 19: 645-651.
- Salvatore S, Vandenplas Y.** Hydrolyzed Proteins in Allergy. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2016; 86: 11-27.
- Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP.** Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med*, 1992; 327: 308-4.
- Sampson HA.** Food allergy. Part1:immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and clinical Immunology*, 1999; 103: 717-728.
- Savage J, Johns C.** Food Allergy: Epidemiology and Natural History. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2015; 35: 45-59.

- Savilahti EM, Rantanen V, Lin JS, Karinen S, Saarinen KM, Goldis M, Mäkelä MJ, Hautaniemi S, Savilahti E, Sampson HA.** Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125: 1315-1321.
- Schonleben S, Sickmann A, Mueller MJ, Reinders J.** Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. *Anal Bioanal Chem*, 2007; 389: 1087-1093.
- Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, Pabst O.** Intestinal CD1031, but not CX3CR11, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*, 2009; 206: 3101-14.
- Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM.** Intestinal CD1031 dendritic cells: master regulators of tolerance ? *Trends Immunol*, 2011; 32: 412-9.
- Serra Bonvehi J.** Azucares, acidez y pH de la jalea real. *Anales de Bromatologia*, 1992; 44: 65-69.
- Sharaf El-Din HA.** Studies on royal jelly production in honeybee production in honeybee colonies. M.Sc. Thesis Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo, Egypt, 2010; 227p.
- Sharma S, Kumar P, Betzel C, Singh TP.** Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001; 756: 183-187.
- Shea-Donohue T, Stiltz J, Zhao A, Notari L.** Mast cells. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010; 12: 349-57.
- Shen LR, Wang YR, Zhai L, Zhou WX, Tan LL, Li ML, Liu DD, Xiao F.** Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015; 16: 155-166.
- Shibi C, Shengming H, Fuhai L, Puxiu L.** Studies on the Relationship Between the Bee Races and the Yield of Royal Jelly. *Honey Bee. Royal jelly. Environment China*, 1993; 40-53.
- Shin TY, Kim SH, Suk K, Ha JH, Kim I, Lee MG.** Anti-allergic effects of *Lycopus lucidus* on mast cell- mediated allergy model. *Toxicology and applied pharmacology*, 2005; 209: 255-262.
- Shinoda M, Nakajin S, Oikawa T, Sato K, Kamogawa A, Akiyama Y.** Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. *Yakugaku Zasshi*, 1978; 98: 139-145.

Siavash M, Shokri S, Haghghi S, Mohammadi M, Shahtalebi MA, Farajzadehgan Z. The efficacy of topical Royal Jelly on diabetic foot ulcers healing: A case series. *Journal of research in Medical Sciences*, 2011; 16: 904-909.

Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 2014; 133: 291-307.

Sicherer SH. Food allergy. *Lancet*, 2002; 360: 701-710.

Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 108: 881-90.

Sicinski P, Rowinski J, Warchol JB, Jarzabek Z, Gut W, Szczygiel B, Bielecki K, Koch G. Polio-virus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology*, 1990; 98: 56-8.

Simuth J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 2001; 32: 69-80.

Šimúth J, Bíliková K, Kováčová E, Kuzmová Z, Schroder W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 2154-2158.

Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2007; 120: 1172-1177.

Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977; 28: 49-55.

Sommanus S, Kerddonfak S, Kamichaisation W, Vilaiyuk S, Sasisakulpor C, Teawsomboonkit W, Benjaponpitak S. Cow's milk protein allergy: immunological response in children with cow's milk protein tolerance. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2014; 32: 171-7.

Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S, Sittipraneed S. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). *J Biochem Mol Biol*, 2003; 36: 572-579.

Srivastava KD, Kattan JD, Zou ZM, Li JH, Zhang L, Wallenstein S, Goldfarb J, Sampson HA, Li XM. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115: 171-178.

- Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, Tjota MY, Seo GY, Cao S, Theriault BR, Antonopoulos DA, Zhou L, Chang EB, Fu YX, Nagler CR.** Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; 111: 13145-50.
- Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E.** Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005; 19: 183-189.
- Stratev D, Vashin I, Balkanska R, Dinkov D.** Antibacterial activity of royal jelly and rape honey against *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7965). *J Food Health Sci*, 2015; 1: 64-74.
- Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I.** A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 1996; 19: 31-38.
- Szanto E, Gruber D, Sator M, Knogler W, Huber JC.** [Placebo-controlled study of melbrosia in treatment of climacteric symptoms]. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 1994; 144: 130-133.
- Takenaka T, Takenaka Y.** Royal Jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996; 60: 518-520.
- Tamura S, Kono T, Harada C, Yamaguchi K, Moriyama T.** Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis merifera*. *Food Chem*, 2009; 114: 1491-1497.
- Taylor SL, Baumert JL.** Cross-contamination of foods and implications for food allergic patients. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2010; 10: 265-70.
- Thacher JD, Gruzieva O, Pershagen G, Neuman A, van Hage M, Wickman M, Kull I, Melén E, Bergström A.** Parental smoking and development of allergic sensitization from birth to adolescence. *Allergy*, 2016; 71: 239-248.
- Thang CL, Zhao X.** Effects of orally administered immunodominant T-cell epitope peptides on cow's milk protein allergy in a mouse model. *Food Research International*, 2015; 71:126-131.
- Thomson AW, Knolle PA.** Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10: 753-66.

- Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM.** Fc gamma receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004; 133: 305-15.
- Tomasi TB, Larson L, Challacombe S, McNabb P.** Mucosal immunity: the origin and migration patterns of cells in the secretory system. *J Allergy Clin Immunol*, 1980; 65: 12-19.
- Toth NM.** The effect of royal jelly on sucklings, dystrophics, convalescents and immatures. XX-Th. Apimondia Congress, Bucharest, Romania, 1965; 568-569.
- Trendelenburg V, Blumchen K.** Allergen-specific immunotherapy for food allergies in childhood. Current options and future perspectives. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2016; 59: 855–864.
- Trumbeckaite S, Dauksiene J, Bernatoniene J, Janulis V.** Knowledge, Attitudes, and Usage of Apitherapy for Disease Prevention and Treatment among Undergraduate Pharmacy Students in Lithuania. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 2015; Article ID 172502; 9 p. doi.org/10.1155/2015/172502
- Tsabouri S, Douros K, Priftis KN.** Cow's milk allergenicity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2014; 14: 16-26.
- Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Yamada K, Urisu A.** Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by. *Clinical and Experimental Allergy*, 2006; 36: 1538-1545.
- Turner PJ, Baumert JL, Beyer K, Boyle R, Chan CH, Clark A, Crevel RW, DunnGalvin A, Fernández Rivas M, Gowland HM, Grabenhenrich L, Hardy S, Houben GF, Hourihane JO, Muraro A, Poulsen LK, Pyrz K, Remington BC, Schnadt S, van Ree R, Venter C, Worm M, Mills CE, Roberts G, Ballmer-Weber BK.** Can we identify patients at risk of life-threatening allergic reactions to food ? *Allergy*, 2016; 71: 1241-55.
- Untersmayr E, Jensen-Jarolim E.** Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol Ther*, 2006; 112: 787-98.
- 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.

Uzbekova D, Chugunova L, Makarova V, Ryabkov A, Mirgorodskaya L. Efficacy of royal jelly and lactulose on thyroxin-induced liver damage in rats. *Hepatology*, 2006; 28: 157.

Van der Heijden PJ, Stok W, Bianchi AT. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology*, 1987; 62: 551-5.

Van Esch BCAM, van Bilsen JHM, Jeurink PV, Garssen A, Penninks AH, Smit JJ, Pieterse RHH, Knippels LMJ. Interlaboratory evaluation of a cow's milk allergy mouse model to assess the allergenicity of hydrolysed M.T. Graham, K.C. Nadeau cow's milk based infant formulas, *Toxicol Lett*, 2013; 220: 95-102.

Van Esch BC, Knipping K, Jeurink P, van der Heide S, Dubois AE, Willemsen LE, Garssen J, Knippels LM. In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. *Toxicology Letters*, 2011; 201: 264-269.

Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio*, 2014; 5: e00889-14.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Pérez Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*, 2008; 73: 117-24.

Vrdoljak D, Miškulin M, Vlahović J, Pavlović N. Cow's milk allergy in the population of infants and early preschoolers from the Vukovar – Srijem County. *Food in health and disease, scientific-professional journal of nutrition and dietetics*, 2014; 3: 84-89.

Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, Colic M. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol*, 2007; 7: 1211-1220.

Wal JM. Allergénicité des protéines laitières. *Innovations agronomiques*, 2011; 13: 25-43.

Wal JM. Cow's milk allergens. *Allergy*, 1998; 53: 1013-1022.

Walker-Smith J. Cow's milk allergy: a new understanding from immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2003; 90: 81-83.

Wang Y, Ma L, Zhang W, Cui X, Wang H, Xu B. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2016; 47: 48-56.

Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology*, 1974; 66: 987-92.

- Wawrzyniak M, O'Mahony L, Akdis M.** Role of regulatory cells in oral tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2017; 9: 107-115.
- Weisse K, Winkler S, Hirche F, Herberth G, Hinz D, Bauer M, Röder S, Rolle-Kampczyk U, Von Bergen M, Olek S, Sack U, Richter T, Diez U, Borte M, Stangl G I, Lehmann I.** Maternal and newborn vitamin D status and its impact on food allergy development in the German LINA cohort study. *Allergy*, 2013; 68: 220-228.
- Wiedermann U, Jahn-Schmid B, Fritsch R, Bauer L, Renz H, Kraft D, Ebner C.** Effects of adjuvants on the immune response to allergens in a murine model of allergen inhalation: Cholera toxin induces a Th1-like response to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Immunol*, 1998; 111: 144-151.
- Wongchai V, Ratanavalacha T.** Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand. *Thammasat Int J Sc Tech*, 2002; 7: 1-8.
- Wu Y, Zhou C, Li X, Song LY, Wu XM, Lin WY, Chen H, Yong BH, Zhao J, Zhang, Sun H, Zhao Y.** Evaluation of anti-inflammatory activity of the total flavonoids of *Laggera pterodonta* on acute and chronic inflammation models. *Phytother Res*, 2006; 20: 585-590.
- Wytrychowski M, Chenavas S, Daniele GI, Casabianca H, Batteau M, Guibert S, Brion B.** Physicochemical characterisation of French royal jelly: comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *J Food Comp Anal*, 2013; 29: 126-133.
- Xue XF, Wu L, Wang K.** Chemical composition of royal jelly. In *Bee Products-Chemical and Biological Properties*; Alvarez-Suarez, JM., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017;181-187.
- Yang W, Tian Y, Han M, Miao X.** Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ*, 2017; 5: e3118.
- Yu LC, Perdue MH.** Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev*, 2001; 179: 61-73.
- Yu LCH.** The Epithelial Gatekeeper Against Food Allergy. *Pediatr Neonatol*, 2009; 50: 247-254.
- Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC.** Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2016; 16: 751-65.
- Zimmermann A.** Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit*, 2002; 8: 53-63.

Publications
Et
Communications

Publications internationales

1. **Malika Guendouz**, Abir Haddi, Hadria Grar, Omar Kheroua, Djamel Saidi, Hanane Kaddouri. Preventive effects of royal jelly against anaphylactic response in a murine model of cow's milk allergy. *Pharmaceutical Biology*, 2017; 55 (1): 2145-2152.
2. **Guendouz Malika**, Mehedi Nabila, Zaoui Chahinaize, Saidi Djamel, Khéroua Omar. Immune response after tartrazine subchronic ingestion in swiss albino mice. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013; 5(2): 584-592.
3. Haddi A, **Guendouz M**, Ainad Tabet S, Mehedi N, Kheroua O, Saidi D. Polyunsaturated fatty acids affect intestinal anaphylactic response in BALB/c mice sensitized with β -lactoglobulin. *Revue française d'allergologie*, 2018; 58: 437-443.

Proceeding

1. **Malika Guendouz**, Abir Haddi, Omar Kheroua, Djamel Saidi, Hanane Kaddouri. Oral administration of royal jelly at different dose protect against increase in anaphylactic response in β -lactoglobulin sensitized Balb/c mice. *Clin Transl Allergy*, 2017; 7 (Suppl 1): 10.
2. Abir Haddi, **Malika Guendouz**, Soraya Ainad Tabet, Youcef Bouferkas, Omar Kheroua, Djamel Saidi. N-3, N-6 polyunsaturated fatty acids effect on the local anaphylactic response and intestinal integrity in a murine model of allergy. *Clin Transl Allergy*, 2017; 7 (Suppl 1):10.
3. A. Haddi, S. Ainad Tabet, D. Redouane, **M. Guendouz**, Y. Bouferkas, O. Kheroua, D. Saidi. Effet des acides gras polyinsaturés de la série n-3 sur l'intégrité de l'épithélium intestinal des souris immunisées à la β -lactoglobuline. *Revue française d'allergologie*, 2016; 56: 280-288.
4. **M. Guendouz**, H. Kaddouri, F.Z. Medjahed, O. Kheroua, D. Saidi. Effet de la gelée royale sur la réponse allergique aux protéines du lait bovin dans un modèle de souris. *Immunologie/Revue française d'allergologie*, 2015; 3: 237-240.
5. **M. Guendouz**, H. Kaddouri, A. Haddi, O. Kheroua, D. Saidi. La gelée royale diminue la réponse immune systémique et intestinale chez la souris Balb/c sensibilisée à la β -lactoglobuline. *Revue Française d'Allergologie*, 2014; 54 (3): 250.

6. Haddi, A. M. Temimi, **M. Guendouz**, L. Amier, O. Khéroua, D. Saidi. Effet des oméga-3 sur l'allergie aux Protéines du lait de vache chez la souris Balb/c. *Revue Française d'Allergologie*, 2014; 54(3): 241.
7. SF Zouaoui, W. Dib, **M. Guendouz**, A. Chekroun, O. Kheroua, D. Saidi. Effet protecteur de *Streptococcus thermophilus* et *Bifidobacterium longum* sur la muqueuse intestinale de souris Balb/c sensibilisées au lait de vache. *Revue Français d'Allergologie*, 2014; 54 (3): 277.
8. **Malika Guendouz**, Hanane Kaddouri, Fatima Zohra Medjahed, Omar Kheroua, Djamel Saidi. La gelée royale prévient le développement d'une réaction anaphylactique intestinale chez la souris utilisée comme modèle d'allergie. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2011; 28: S67–S240.

Communications internationales

1. **Malika Guendouz**, Abir Haddi, Omar Kheroua, Djamel Saidi and Hanane Kaddouri. Composition of fresh Royal Jelly produced in Algeria and its anti-allergic effect. *The First International Conference on Apiculture, Hive Products and Sustainable Development (ICAHPSD)*, 25-27 November 2018, Mostaganem, Algeria.
2. **M. Guendouz**, N. Mehedi, C. Zaoui, A. Mehidi, D. Saidi, O. Khéroua. Subchronic ingestion of Tartrazine (FD & C Yellow No. 5) and its effects on humoral immune response and intestinal structure in mice Swiss. *The First International Congress of Immunology and Molecular Immunopathology*, 17-20 October 2014, Tlemcen, Algeria.
3. Mehedi A, Mehedi N, **Guendouz M**, Zouaoui S, Chekroun A, Khéroua O, Saidi D. Etude de l'activité des disaccharidases intestinales après ingestion subchronique du colorant E102 chez la souris. *1^{er} Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivité*, 26-27 November 2014, Oran, Algérie.
4. Abderrahmane F, Abderrahmane H, Mezemaze F, Khéroua O, **Guendouz M**. Caractéristiques biochimiques des protéines et des hydrolysats du lait de dromadaire et de vache. *4^{ème} Forum International Paramédical*. 28-29 Mai 2014, Ain Témouchent, Algérie.
5. **Guendouz Malika**, Mehedi Nabila, Saidi Djamel, Khéroua Omar. Evaluation de la réponse immunitaire spécifique chez la souris Swiss après ingestion subchronique de la tartrazine. *Congrès International de Nutrition*, 22-23 mai 2011, Oran, Algérie.

6. Mehedi N, Ainad-Tabet S, Mokrane N, Alami O, **Guendouz M**, Zaoui C, Khéroua O, Saidi Djamel. L'ingestion subchronique de la tartrazine affecté la fertilité de la souris Swiss. *Congrès International de Nutrition*, 22-23 mai 2011, Oran, Algérie.

Rapport-Gratuit.com

Annexes

Annexe 1

❖ La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s'effectue en trois étapes:

Étape 1: Digestion ou minéralisation de l'échantillon

L'azote protéique des déchets organiques est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique concentré à haute température, en présence d'un catalyseur et d'un sel:

❖ L'acide sulfurique concentré a pour but d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniac NH_3 . Il sert également à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium, par action de la base avec l'acide.

❖ L'addition du sel K_2SO_4 a pour but d'élever le point d'ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.

❖ Le catalyseur utilisé est Cu (CuSO_4). Après 5 heures de digestion à l'acide sulfurique concentré en passe à la deuxième étape.

Étape 2: Distillation de l'ammoniac

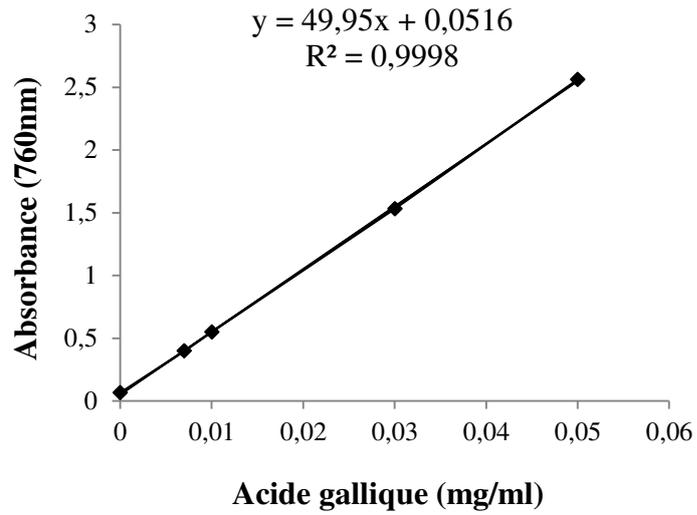
Avant de distiller l'ammoniac à la vapeur d'eau, on doit libérer l'ammoniac sous la forme du sel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès: L'ammoniac est ensuite distillé par la vapeur d'eau et piégée dans une solution d'acide borique. L'ammoniac réagit avec l'acide borique pour former des sels borates d'ammonium.

Étape 3: Titrage de l'ammoniac

L'ammoniac sous la forme de borates d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide (HCl) et d'un indicateur coloré.

Annexe 2. Table de conversion glucose en mg établie expérimentalement par G. Bertrand

Cuivre en mg	Glucose en mg	Cuivre en mg	Glucose en mg	Cuivre en mg	Glucose en mg
20,4	10	79,3	41	131,4	71
22,4	11	81,1	42	133,1	72
24,3	12	82,9	43	134,7	73
26,3	13	84,7	44	136,3	74
28,3	14	86,4	45	137,9	75
30,2	15	88,2	46	139,6	76
32,2	16	90,0	47	141,2	77
34,2	17	91,8	48	142,8	78
36,2	18	93,6	49	144,5	79
38,1	19	95,4	50	146,1	80
40,1	20	97,1	51	147,7	81
42,0	21	98,9	52	149,3	82
43,9	22	100,6	53	150,9	83
45,8	23	102,3	54	152,5	84
47,7	24	104,1	55	154,0	85
49,6	25	105,8	56	155,6	86
51,5	26	107,6	57	157,2	87
53,4	27	109,3	58	158,8	88
55,3	28	111,1	59	160,4	89
57,2	29	112,8	60	162,0	90
59,1	30	114,5	61	163,6	91
60,9	31	116,2	62	165,2	92
62,8	32	117,9	63	166,7	93
64,6	33	119,6	64	168,3	94
66,5	34	121,3	65	169,9	95
68,3	35	123,0	66	171,5	96
70,1	36	124,7	67	173,1	97
72,0	37	126,4	68	174,6	98
73,8	38	128,1	69	176,2	99
75,7	39	129,8	70	177,8	100
77,5	40				



Annexe 3. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques.

RESUME

Le but de ce travail est de vérifier si la gelée royale (GR) pouvait prévenir le développement d'une réponse immune systémique et anaphylactique intestinale dans un modèle murin (Balb/c) sensibilisé à la β -lactoglobuline (β -Lg). La GR utilisée dans ce travail a d'abord fait l'objet d'une étude physico-chimique. Ensuite et en vue de d'étudier son effet immunomodulateur, des souris Balb/c traitées par voie orale pendant 7 jours avec la GR aux doses de 0,5, 1 et 1,5 g/kg ont été sensibilisées par voie intrapéritonéale à la β -Lg. L'éventuel effet de la GR est évalué par l'étude de la réponse immune systémique, la réponse anaphylactique locale ainsi que par l'étude histologique intestinale et le comptage des mastocytes jéjunaux. Nos résultats montrent que la GR diminue significative les anticorps sériques (IgG, IgE) anti- β -Lg, et les taux d'histamine plasmatique. De plus, nous n'avons observé aucun signe clinique ou baisse de la température corporelle chez les souris prétraitées à la GR. La GR a permis aussi d'inhiber la réponse anaphylactique locale et a réparé les anomalies jéjunales secondaires à la sensibilisation à la β -Lg. Ces résultats nous permettent d'affirmer l'effet immunomodulateur et préventif de la GR lors de l'allergie aux protéines du lait de vache.

Mots clés:

Gelée royale; APLV; Immunomodulateur; Anticorps sériques; Chambre de Ussing; Signe clinique; β -lactoglobuline; Mastocyte; Anaphylaxie locale; Balb/c.