

Sommaire

Introduction.....	9
I. Les allergies	10
1. Epidémiologie et prévalence des allergies alimentaires.....	10
2. Définitions et nomenclature des réponses d'hypersensibilité	11
3. Mécanisme d'une réaction allergique de type I	12
a. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).....	14
b. Les lymphocytes Th2.....	14
c. Les IgE et leur récepteur	15
d. Les cellules effectrices	16
II. Mécanismes immunopathologiques de l'allergie alimentaire.....	18
1. Le système immunitaire associé à l'intestin	18
2. Les cellules dendritiques de l'intestin	19
3. Les ILC2.....	19
4. Les cellules effectrices de l'intestin.....	20
5. Mécanismes de mise en place et de régulation des réponses aux antigènes alimentaires ...	20
a. Réponse normale à un aliment : l'induction de tolérance	20
i. Rôle des DC de l'intestin pour l'induction de tolérance orale.....	21
ii. Rôle des lymphocytes T régulateurs pour l'induction de tolérance.....	21
b. La sensibilisation à un allergène alimentaire	22
i. Le rôle du microbiote intestinal.....	23
ii. La barrière épithéliale.....	24
III. Immunothérapie de l'allergie.....	26
1. L'ITS ou désensibilisation	26
2. Les VLP : vecteur de choix pour l'antigène dans l'immunothérapie.....	28
a. Les pseudo-particules virales	29
b. Les rétroVLP : plateforme antigénique	29
c. Intérêt des rétroVLP en immunothérapie	30
Objectifs de mon stage.....	32
Principe expérimental	32
Matériel et méthodes	35
I. Préparation des plasmides	35
II. Culture cellulaire et production de rétroVLP	35
III. Western Blot.....	36
IV. Animaux et modèle d'allergie alimentaire à l'ovalbumine.....	37

V. Validation de la transfection in vivo des plasmides.....	37
VI. Capture de l'antigène : modèle in vivo	38
VII. Préparation des cellules immunitaires	39
VIII. Cytométrie en flux.....	39
IX. Immunofluorescence	40
Résultats.....	44
I. Immunothérapie de l'allergie alimentaire.....	44
1. Modèle d'étude de l'allergie alimentaire.....	44
2. Validation de la construction pVLP-Gag-OVA	46
3. Validation in vitro et in vivo des constructions génétiques pIL2 et pIL10	48
4. Effet préventif de la combinaison pVLP et pIL2 ou pIL10	50
5. Effet des plasmides pIL2 et pIL10.....	54
6. Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL2	56
7. Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL10	59
II. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie par les VLP.....	62
1. Validation de la formation et de la fluorescence des VLP Gag-GFP.....	62
2. Capture des VLP Gag-GFP par les cellules de l'intestin	64
a. Stratégie de définition des populations de cellules immunitaires	64
b. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules de l'intestin.....	66
3. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules des poumons	69
a. Stratégie de définition des populations de cellules immunitaires des poumons	69
b. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules des poumons	71
4. Visualisation de la capture des VLP-GFP par immunofluorescence.....	73
Discussion et perspectives.....	76
I. Immunothérapie	76
1. Modèle d'étude de l'allergie alimentaire.....	76
2. Stratégie de traitement par ADN : les plasmoVLP.....	77
II. Mécanismes immunologiques	77
1. Etude par cytométrie en flux	78
2. Etude par immunofluorescence	80
III. L'association des plasmoVLP avec pIL2 ou pIL10	81
Annexes	84
Bibliographie.....	89

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Prévalence des allergies alimentaires	10
Figure 2 : Mécanismes des réactions allergiques.....	13
Figure 3 : Schéma de la structure du récepteur Fc ϵ RI	16
Figure 4 : Schéma de la structure de l'intestin grêle.....	18
Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action de l'immunothérapie spécifique	27
Figure 6 : Schéma d'une rétroVLP	30
Figure 7 : Modèle d'étude de l'allergie alimentaire.....	45
Figure 8 : Validation de la construction pVLP Gag-OVA.....	47
Figure 9 : Validation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des constructions génétiques pIL2 et pIL10	49
Figure 10 : Effet préventif de la combinaison pVLP et pIL2 ou pIL10	52
Figure 11 : Effet des plasmides pIL2 et pIL10.....	55
Figure 12 : Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 μ g et pIL2	58
Figure 13 : Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 μ g et pIL10	60
Figure 14 : Validation de la formation et de la fluorescence des rétroVLP Gag-GFP	63
Figure 15 : Stratégie de définition des différentes populations de cellules immunitaires	65
Figure 16 : Capture <i>in vivo</i> des VLP-GFP par les cellules de l'intestin.....	68
Figure 17 : Stratégie de définition des différentes populations de cellules immunitaires dans les poumons	70
Figure 18 : Capture <i>in vivo</i> des VLP-GFP par les cellules des poumons.....	72
Figure 19 : Visualisation de la capture des VLP-GFP par immunofluorescence	74
Annexe 2 : Capture de l'ovalbumine A488 par les cellules de l'intestin dans le modèle ex vivo.....	86
Annexe 3 : Visualisation des cellules immunitaires par immunofluorescence	87

Tableau

Tableau 1 : Résumé des expériences de capture des VLP-GFP dans les intestins	67
Annexe 1 : Tableau des anticorps utilisés en cytométrie de flux.....	85

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé

ITS : immunothérapie spécifique de l'allergène

SCIT : immunothérapie par voie sous-cutanée

MALT : « Mucosae Associated Lymphoid Tissue » (tissus lymphoïdes associés aux muqueuses)

IEL : lymphocytes intra-épithéliaux

LPL : lymphocytes de la lamina propria

PP : plaque de Peyer

LT : lymphocytes T

LB : lymphocytes B

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

DC : « dendritic cells » (cellules dendritiques)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

HPV : « human papillomavirus » (papillomavirus humain)

HBV : « hepatitis B virus » (virus de l'hépatite B)

VLP : « virus like particles » (pseudo-particules virales)

rétroVLP : VLP dérivées du rétrovirus MLV

plasmoVLP : plasmide codant pour les VLP

MLV : « murine leukemia virus » (virus de la leucémie murine)

Gag : gène codant pour les protéines de capside du MLV

Gag-GFP : gène codant pour la protéine de fusion de la capside et de la GFP

GFP : « green fluorescent protein »

Gag-Ova : gène codant pour la protéine de fusion de la capside et de l'ovalbumine

OVA : ovalbumine, protéine de l'œuf

Ig : immunoglobuline (IgG, IgE, IgA)

Ag : antigène

Ac : anticorps

SVF : sérum de veau fœtal

HEK : « human embryonic kidney » (lignée de cellules rénales embryonnaires humaines)

INTRODUCTION

Introduction

La réaction allergique ou réaction d'hypersensibilité est la conséquence d'une réponse immunitaire excessive de l'organisme suite à la rencontre avec une substance étrangère : l'allergène.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) considère l'allergie comme la quatrième maladie dans le monde après le cancer, les pathologies cardiovasculaires et le sida (2015). Les maladies allergiques (dermatite, asthme, rhinite, conjonctivite et allergies alimentaires) sont donc un problème majeur de santé publique. La prévalence de ces maladies a beaucoup augmenté dans les pays industrialisés au cours des 20-30 dernières années suite à des modifications rapides de notre environnement. En effet, de nombreux facteurs tels que l'augmentation de la température dans les maisons (multiplication des acariens), les modifications du régime alimentaire (allergènes dans la nourriture), le développement des médicaments (impliqués dans certaines allergies) ou encore la pollution ou le tabac jouent un rôle dans l'augmentation de la prévalence de ces maladies.

Il existe plusieurs catégories d'allergènes. Certains allergènes peuvent déclencher des allergies de type respiratoire comme les acariens, les poils d'animaux ou les pollens. Des allergènes de contact (latex, cosmétiques, parfums etc.) provoquent des réactions cutanées. D'autres allergènes, plus nombreux, pénètrent le corps par ingestion et sont responsables d'allergies alimentaires. Plus de 50 % des allergènes alimentaires se trouvent dans le lait, les œufs, les arachides et les produits de la mer, mais tous les aliments sont capables de déclencher une allergie (Rona et al., 2007). Les allergies alimentaires peuvent entraîner de nombreuses réactions donnant lieu à des symptômes gastro-intestinaux mais aussi des symptômes cutanés ou respiratoires. Elles sont également responsables de réactions plus rares mais violentes pouvant entraîner la mort suite à un choc anaphylactique. Le nombre de personnes souffrant d'allergies alimentaires est en augmentation pourtant il n'existe pour l'instant aucun traitement curatif pour ces allergies.

Dans cette introduction, nous nous intéressons plus particulièrement aux allergies alimentaires en mettant en avant l'étendue mondiale de ce type d'allergies, leur définition et leurs classifications, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires associés. Nous

détaillerons les populations cellulaires et les molécules impliquées puis les mécanismes de mise en place et de régulation des réponses aux antigènes alimentaires. Enfin, nous verrons les thérapies actuelles et les nouvelles approches thérapeutiques en cours d'études pour répondre aux difficultés d'établir des traitements efficaces contre les allergies alimentaires.

I. Les allergies

1. Epidémiologie et prévalence des allergies alimentaires

De nombreuses études évaluent la prévalence des allergies alimentaires dans le monde mais l'incidence exacte de ces maladies est difficile à établir. Les résultats diffèrent surtout en fonction du diagnostic de l'allergie : lorsque l'allergie est identifiée par la recherche d'anticorps IgE dans le sérum ou par des tests cutanés (SPT), la prévalence est estimée entre 2 et 5% tandis que lorsqu'elle est identifiée par le test de provocation orale, la prévalence varie de 1 à 10,8% (Rona et al., 2007). Cependant, si l'on considère de l'ensemble des études, les allergies alimentaires dans les pays développés toucheraient environ 5% des adultes et 8% des enfants (Sicherer and Sampson, 2014). Par ailleurs, la prévalence des allergies alimentaires semble augmenter depuis plusieurs années. Par exemple, une étude aux Etats-Unis évalue à 18% l'augmentation des allergies alimentaires chez les enfants entre 1997 et 2007 (Sicherer, 2011; Wang and Sampson, 2011). Au Royaume-Uni, les admissions à l'hôpital pour des allergies alimentaires ont augmenté de 500% entre 1990 et 2007 (Gupta et al., 2007).

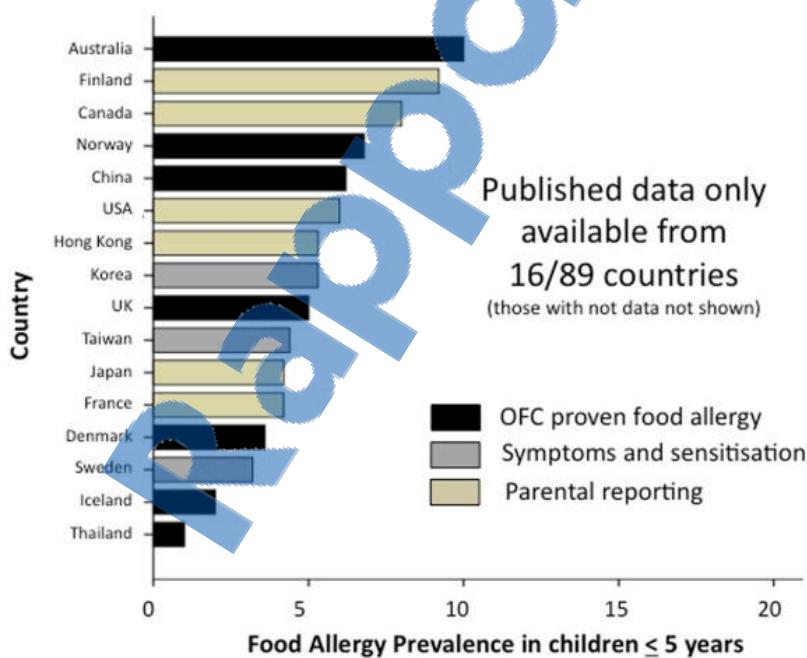


Figure 1 : Prévalence des allergies alimentaires rapportée dans chaque pays chez les enfants de moins de 5 ans et déterminée par un test de provocation par voie orale (OFC) (barre noire) ou par l'évaluation des symptômes (barre grise) ou rapporté par les parents (barre beige). (Prescott et al., 2013).

Quelles que soient les méthodes d'études, on constate que les symptômes des allergies alimentaires ainsi que les allergènes responsables de ces réactions varient en fonction de plusieurs facteurs, notamment la localisation géographique. En effet, plusieurs études montrent des variations cliniques et immunologiques parmi des patients de différents pays sujets à une réaction allergique pour le même aliment (Vereda et al., 2011). D'autres paramètres comme le sexe, des facteurs génétiques ou ethniques ou encore des changements liés à l'alimentation peuvent influer sur le risque d'allergies alimentaires (Lack, 2012). Enfin, une autre hypothèse est avancée : les pratiques d'hygiène actuelles dans les pays industrialisés. Les enfants seraient moins exposés aux agents infectieux durant les premières années de leur vie, ce qui modifierait le développement de leur système immunitaire et augmenterait le risque d'allergies (Bager et al., 2008).

2. Définitions et nomenclature des réactions d'hypersensibilité

Un sujet *atopique* est une personne qui présente une prédisposition génétique favorisant la sensibilisation à un allergène lorsqu'elle y est exposée et donnant lieu à une hypersensibilité impliquant une production d'IgE.

En 2003, l'Organisation mondiale de l'allergie (WAO : World Allergy Organization) a publié un rapport qui redéfinit la nomenclature des allergies alimentaires. Le terme *hypersensibilité* doit être utilisé pour décrire des symptômes ou signes qui se reproduisent systématiquement lors d'une exposition à un stimulus défini, à une dose normalement tolérée par la population. L'allergie est une réaction d'hypersensibilité qui implique des mécanismes immunologiques médiés par des anticorps ou des lymphocytes (Johansson et al., 2004). Notons que les intolérances alimentaires, les réactions pseudo-allergiques et les réactions pseudo-anaphylactiques sont des hypersensibilités non allergiques.

Les réactions d'hypersensibilité allergique décrites en 1963 par Gell et Coombs (Descotes and Choquet-Kastylevsky, 2001) peuvent être classées par type de réponse en fonction des effecteurs impliqués, des délais de réaction, du mécanisme et des symptômes cliniques. L'hypersensibilité allergique de type I, la plus courante, est médiée par les immunoglobulines de type E (IgE). Les symptômes apparaissent très rapidement après l'exposition à un allergène (5 à 30 minutes) c'est pourquoi elle porte également le nom d'hypersensibilité immédiate. Les conséquences de cette hypersensibilité peuvent être une rhinite allergique,

une dermatite atopique ou des allergies alimentaires, mais peuvent aussi être des réactions plus graves voire potentiellement mortelles, certaines se traduisant par un choc anaphylactique entraînant un arrêt respiratoire ou cardiaque. Les réactions de type II sont dites cytotoxiques ou cytolytiques. Elles mettent en jeu des IgG ou IgM qui, via l'activation du système du complément ou par des phénomènes d'ADCC (Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps) vont aboutir à la lyse des cellules sanguines. Les hypersensibilités de type III, quant à elles, sont induites par des complexes immuns. Enfin, les hypersensibilités de type IV impliquent la reconnaissance de l'allergène par les lymphocytes T spécifiques qui, en présence de l'antigène, induisent la production de cytokines inflammatoires et activent les lymphocytes cytotoxiques.

Les réactions allergiques alimentaires sont associées aux IgE ou sont des allergies engendrées par des réactions cellulaires. Dans certains cas, les allergies alimentaires peuvent faire appel à une combinaison de ces deux mécanismes, complexifiant davantage sa classification et son étude.

Dans ce rapport, nous ne nous intéresserons qu'à la réaction allergique immédiate ou hypersensibilité de type I dans un modèle d'allergie alimentaire.

3. Mécanisme d'une réaction allergique de type I

Plusieurs phases peuvent être décrites, expliquant les allergies :

Phase de sensibilisation

Lors du premier contact avec l'organisme, l'allergène alimentaire introduit par le tractus digestif est capté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) notamment les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes B. L'allergène est dégradé en peptides et après migration des CPA vers les ganglions drainants, ce peptide est présenté par les CPA via le CMH de classe II aux lymphocytes T (LT) CD4+ naïfs. Lors d'une allergie, les lymphocytes T CD4+ activés vont se différencier en lymphocytes T CD4+ de type Th2. L'augmentation de la population des cellules T CD4+ de type Th2 va créer un déséquilibre au niveau du système immunitaire et notamment de la balance entre les lymphocytes T CD4+ de type Th1 et ceux de type Th2. Ces lymphocytes Th2 vont secréter des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 ou encore l'IL-13 qui vont activer des cellules effectrices, principalement les éosinophiles et les

basophiles. L'IL-4 va également induire la maturation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques de l'allergène. Les IgE produits en grande quantité lors de la phase de sensibilisation se fixent sur les récepteurs Fc ϵ RI présents à la surface des mastocytes et des basophiles, les pré-activant. Cependant cette phase est dite asymptomatique puisque le sujet se sensibilisant à l'allergène ne présente aucun symptôme.

Phase de réaction allergique

Lorsque l'organisme rencontre à nouveau l'allergène, celui-ci se fixe rapidement sur les IgE des mastocytes et basophiles entraînant leur dégranulation et la libération de médiateurs de l'inflammation. De nombreuses molécules sont alors libérées comme l'histamine ou la tryptase ainsi que des cytokines ou chimiokines, plus exactement l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13 qui vont favoriser ce phénomène d'inflammation par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la survenue d'une vasodilatation, d'une dégradation tissulaire locale et le recrutement et l'activation d'autres cellules, tels les éosinophiles qui vont également libérer des cytokines pro-inflammatoires.

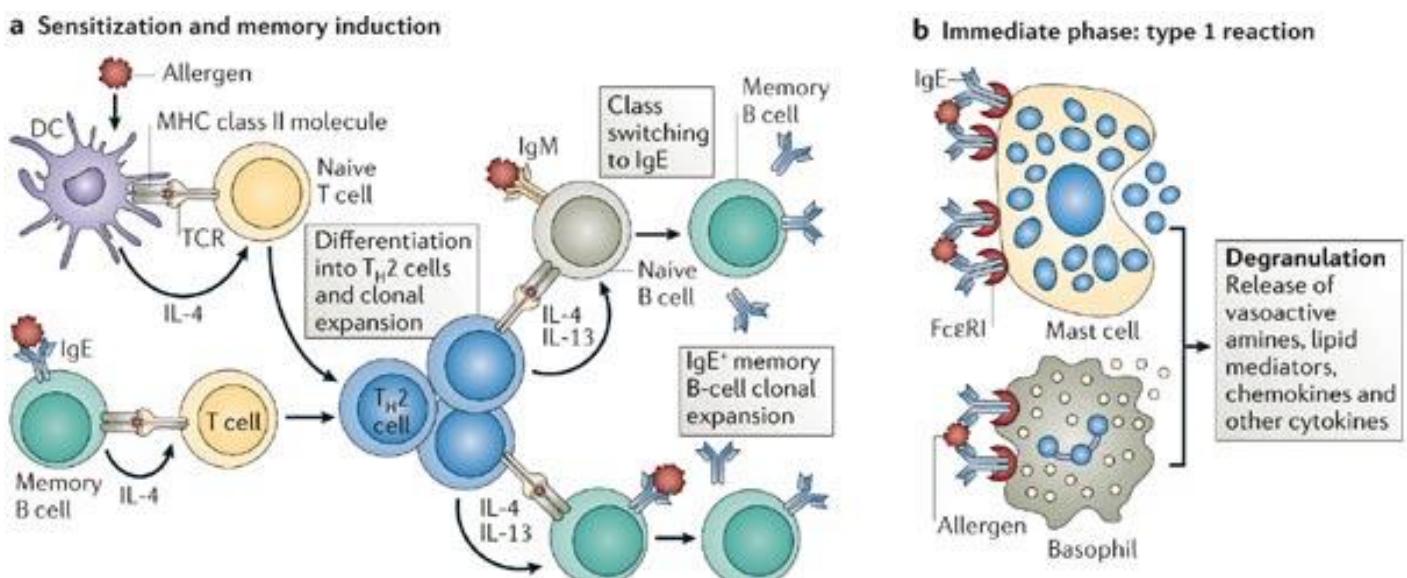


Figure 2 : **Mécanismes des réactions allergiques.** (A) Phase de sensibilisation à l'allergène et développement de cellules B spécifiques et de cellules T mémoires. (B) Réaction d'hypersensibilité de type I (Larché et al., 2006)

a. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Ces cellules constituent un groupe hétérogène composé de cellules dendritiques (DC), de macrophages et de lymphocytes B. Les plus importantes CPA sont les cellules dendritiques dont la fonction principale est la présentation d'antigènes grâce à leur grande capacité de capture des antigènes. L'importance des cellules dendritiques pour l'induction d'une réponse Th2 a été montrée par des expériences de déplétion de ces cellules ou par le blocage de leur fonction. En effet, lorsque les cellules dendritiques sont supprimées ou neutralisées, aucune réaction allergique ne se développe (van Rijt et al., 2005). Dans les ganglions mésentériques, les cellules dendritiques interagissent avec les lymphocytes T pour induire leur différenciation. La différenciation des Th en Th2 requiert l'activation de certains facteurs de transcription notamment GATA3, STAT-5 et STAT-6. Ces facteurs sont sous l'influence de certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-2 ou TSLP produites par les cellules dendritiques en réponse aux antigènes. D'autres marqueurs de surface des DC sont également importants pour la différenciation Th2. Il a été montré que l'expression du ligand d'OX40 (OX40L) et de CD40 est nécessaire pour l'orientation Th2 (Jenkins et al. 2007).

b. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 sont des cellules présentes en cas d'infection parasitaire ou d'allergies. Ces cellules produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. L'IL-5 stimule la différenciation des éosinophiles alors que l'IL-4 et l'IL-13 agissent sur la contraction des muscles et la production de mucus de l'intestin. L'IL-4 permet aussi la production d'IgE par les plasmocytes.

Différentes voies de signalisation sont impliquées pour la différenciation des lymphocytes Th naïfs en Th2. L'IL-4 produit lors de la réponse immunitaire par les basophiles et les lymphocytes T eux-mêmes va activer STAT6 (Sokol et al., 2008). STAT6 est nécessaire pour augmenter l'expression de GATA3 qui est un des principaux facteurs clefs de la différenciation en Th2. La diminution ou la délétion de GATA3 résulte d'une réduction des cellules Th2 (Zhu et al., 2004). Le niveau d'activation de STAT5 joue également un rôle : STAT5 est nécessaire pour la prolifération et la survie des lymphocytes T CD4 mais une plus forte activation de STAT5 est essentielle pour une différenciation en lymphocytes Th2 (Zhu et al., 2003). L'expression de GATA3 et l'activation de STAT5 agissent directement sur les gènes par des réorganisations de la chromatine et des modifications épigénétiques. Une fois

les cellules différenciées, la production de cytokines requiert une stimulation antigénique par l'intermédiaire du TCR. Un signal TCR fort induit une différenciation Th1 tandis qu'un signal faible génère des cellules Th2 (van Panhuys et al., 2014). Plusieurs signaux de co-stimulation vont également influencer la différenciation des lymphocytes. OX40 et ICOS vont favoriser la différenciation Th2 tandis que CTLA-4 est un régulateur négatif de cette orientation (Bour-Jordan et al., 2003; Watanabe et al., 2005).

c.Les IgE et leur récepteur

La concentration d'IgE dans le sérum est la plus faible des cinq types d'immunoglobulines ou anticorps (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) en condition physiologique. Chez l'adulte non allergique, la concentration sérique des IgE varie de 0,05 µg/mL à 1 µg/mL contre 10 µg/mL pour les IgD. On retrouve également les IgE dans les sécrétions telles que la salive, l'urine ou les selles. Elles sont normalement produites pour lutter contre des infections parasitaires au niveau des sites d'infection comme la peau, les poumons ou les intestins.

La production d'IgE par les plasmocytes en réponse à un antigène requiert le changement isotypique des IgD en IgE par la modification de la partie constante de l'anticorps. Les immunoglobulines E sont monomériques et constituées de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes comprenant un domaine variable et quatre domaines constants ; et deux chaînes légères κ ou λ. Les parties C-terminales des chaînes lourdes constantes contiennent le site de liaison aux récepteurs pour les IgE : FcεR.

Il existe deux types de récepteurs pour les IgE : le récepteur de faible affinité FcεRII ou CD23 exprimé à la surface des lymphocytes B ainsi que d'autres cellules hématopoïétiques, et le récepteur de haute affinité FcεRI. Chez la souris, FcεRI est exprimé par les mastocytes et les basophiles sous forme de tétramère ($\alpha\beta\gamma\gamma$), alors que chez l'homme il existe également une forme trimérique ($\alpha\gamma\gamma$) exprimée par les cellules présentatrices d'antigène (monocytes, cellules de langerhans et cellules dendritiques) ainsi que par les éosinophiles et les plaquettes. La demi-vie du FcεRI à la surface des mastocytes dépend des IgE qui en se liant au récepteur augmentent sa stabilité et son expression. En effet, un récepteur FcεRI vide reste à la surface des cellules seulement quelques heures (environ 24h) tandis qu'un récepteur lié à une IgE est exprimé de façon permanente.

La chaîne α du récepteur Fc ϵ RI se lie aux IgE et est constituée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte partie cytoplasmique (Fig. 4). La sous-unité β est constituée de quatre domaines transmembranaires comprenant un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) qui s'associe avec une kinase Lyn. Les deux sous-unités γ forment un dimer dont chaque unité contient également un motif ITAM. Lorsque les IgE se fixent à la chaîne α du Fc ϵ RI, l'association de Lyn avec les motifs ITAM active une cascade de signalisations aboutissant à l'activation et à la dégranulation des mastocytes ou des basophiles.

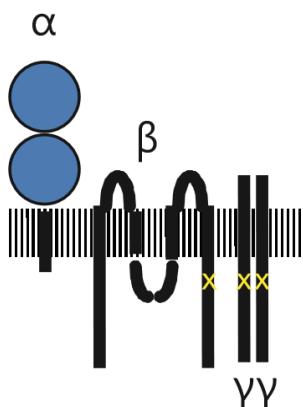


Figure 3 : Schéma de la structure du récepteur Fc ϵ RI (Turner and Kinet, 1999)

d. Les cellules effectrices

Les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles sont les principales cellules effectrices de l'allergie.

Les mastocytes sont des cellules résidentes des tissus et ont un rôle dans les premiers instants de la réaction d'allergie. Les mastocytes proviennent de la moelle osseuse dans laquelle ils se différencient et prolifèrent grâce à leur récepteur c-kit et sous l'influence de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-9 ou l'IL-10. Les progéniteurs des mastocytes quittent la moelle osseuse et se dirigent vers les différents tissus. Par la suite, les mastocytes restent dans les tissus et n'entrent pas dans la circulation sanguine. Pendant une réaction allergique, les IgE recouvrent la surface des mastocytes activant la fusion des granules des mastocytes avec la membrane plasmique et la libération du contenu des granules. De nombreux médiateurs sont libérés comme l'histamine responsable d'une vasodilatation et d'une

angiogenèse ; des chimiokines comme MCPT-1, RANTES ou l'éotaxine provoquant l'attraction et l'infiltration des leucocytes; des enzymes favorisant l'inflammation et l'endommagement des tissus (chymase, tryptase etc.) et de nombreux peptides et peptidoglycanes. D'autres médiateurs sont également nouvellement synthétisés durant cette activation : des cytokines telles que l'IL-5 ou le TNF- α stimulant la migration, l'activation et la prolifération des autres cellules immunitaires. En effet, l'IL-4 et l'IL-5 relâchées vont stimuler la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et induire le changement de classe des immunoglobulines. L'IL-5 va également stimuler la croissance et la différenciation des éosinophiles. Des facteurs de croissance sont également nouvellement synthétisés par les mastocytes ainsi que des phospholipides comme des leucotriènes et des prostaglandines (Theoharides et al., 2012).

Les polynucléaires basophiles ont beaucoup de points communs avec les mastocytes notamment l'expression du Fc ϵ RI, la sécrétion de cytokines TH2 et le relargage d'histamine après activation. Cependant, ils proviennent d'un lignage différent, et leur différenciation ainsi que leur maturation dans la moelle osseuse s'effectuent sous l'influence de l'IL-3. Ils entrent ensuite dans la circulation sanguine où ils représentent moins de 1% des leucocytes. Contrairement aux mastocytes, les basophiles sécrètent beaucoup d'IL-4 et d'IL-13 mais peu d'IL-5 tandis que les mastocytes sécrètent principalement de l'IL-5 et de l'IL-13 et peu d'IL-4. Les basophiles agissent pendant des phases plus tardives de la réaction allergique.

Les polynucléaires éosinophiles représentent 1 à 3% des leucocytes du sang. Ils ont un progéniteur hématopoïétique commun avec les basophiles mais seul l'IL-5 permet le développement et la différenciation de ces progéniteurs en éosinophiles. La différenciation s'effectue dans la moelle osseuse puis les éosinophiles sont relâchés dans la circulation sanguine pour rejoindre les tissus. La grande majorité des éosinophiles est localisée dans les muqueuses du tractus intestinal et des poumons et sur les sites d'inflammation.

II. Mécanismes immunopathologiques de l'allergie alimentaire

1. Le système immunitaire associé à l'intestin

La sensibilisation vis-à-vis d'un allergène de type aliment se produit par notre système immunitaire au niveau de l'intestin, plus spécifiquement par les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour Mucosae Associated Lymphoid Tissue).

La muqueuse de l'intestin grêle est composée de trois couches :

- L'épithélium est en contact avec la lumière intestinale : il contient des entérocytes qui composent des microvillosités piégeant les nutriments et assurant leur transport vers le sang. Les cellules épithéliales exportent, à l'inverse, des anticorps IgA vers la lumière intestinale qui vont assurer une protection de l'organisme contre les pathogènes. D'autres cellules calciformes sécrètent le mucus qui agit contre les micro-organismes progressant dans la lumière. Entre les cellules épithéliales sont logés les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) dont la plupart sont des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ aux fonctions cytotoxiques.
- Un tissu conjonctif appelé « lamina propria » supporte cet épithélium et contient des capillaires lymphatiques et sanguins qui absorbent les produits ayant traversé l'épithélium. C'est dans ce tissu que résident et circulent les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes T (CD4+, CD8+ et Treg), des lymphocytes B sécréteurs d'anticorps et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), comprenant les cellules dendritiques et les macrophages.
- Enfin, le tissu musculaire permet des mouvements localisés de la muqueuse.

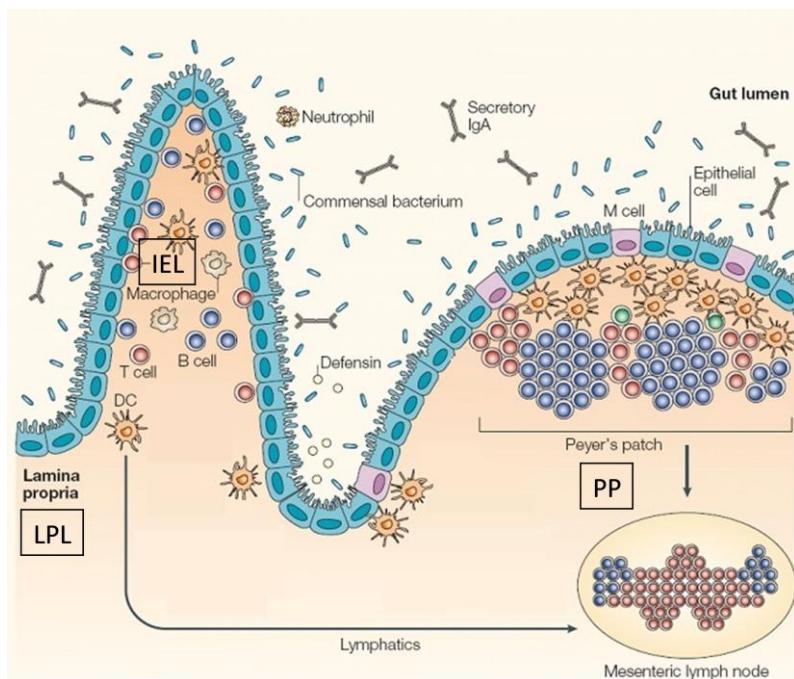


Figure 4 :
Schéma de la structure de l'intestin grêle. Les villosités (à gauche) sont composées d'une couche de cellules épithéliales qui contient des IEL, et d'un tissu appelé lamina propria dans lequel circulent les LPL. Les plaques de Peyer (à droite) sont composées principalement de cellules immunitaires. Dans la couche de cellules épithéliales des PP se trouvent des cellules M.

En plus des cellules immunitaires présentes dans la muqueuse intestinale, on distingue des structures lymphoïdes spécifiques : les plaques de Peyer (PP). Les plaques de Peyer sont composées majoritairement de lymphocytes B et constituent les sites inducteurs majeurs des réponses immunitaires de l'intestin grêle. Leur épithélium est particulier et comporte des cellules épithéliales spécialisées appelées « cellules M » qui captent de manière sélective les antigènes et leur font traverser leur cytoplasme par un mécanisme d'endocytose. Sous la membrane basale des cellules M se trouvent des CPA qui, à la suite de la capture de l'antigène, vont dégrader l'antigène en peptides et le présenter aux lymphocytes présents dans les ganglions drainants.

2. Les cellules dendritiques de l'intestin

Il existe plusieurs types de cellules dendritiques dans l'intestin. Certaines de ces cellules dendritiques expriment le récepteur CX3CR1 nécessaire à l'extension des dendrites ce qui leur permet de capter les antigènes dans la lumière intestinale en étendant leurs dendrites par les espaces entre les cellules épithéliales. Ce type de DC ne migrent pas mais peuvent transférer l'antigène à d'autres cellules dendritiques de la lamina propria CX3CR1- CD103+ (Mazzini et al., 2014). Les DC CD103+ expriment le CCR7 et migrent dans les ganglions drainants. Ces cellules collectent également les antigènes en interagissant directement avec les entérocytes, ou encore en absorbant les antigènes dans les plaques de Peyer (Mowat, 2003).

3. Les ILC2

Les ILC2 sont un groupe de cellules lymphoïdes innées (ILC) rencontrées au niveau de l'intestin. Ces cellules sont semblables à des lymphocytes et leur développement requiert aussi le facteur de transcription GATA3. Cependant, elles ne comportent pas de TCR ni de BCR et n'expriment pas de marqueurs de lignée CD3, B200, CD11b, Ter119 et Gr-1. Par ailleurs, elles expriment le CMH-II (Hepworth et al., 2013) et sont caractérisées par l'expression des récepteurs pour l'IL-25, l'IL-33 et du récepteur pour l'IL-2 (IL-2R α , CD25), ainsi que par la production de cytokines de type Th2 comme l'IL-5 et l'IL-13. Les ILC2 sont activées à la suite d'une lésion par des cytokines produites par les cellules épithéliales telles que l'IL-33, l'IL-25 et la TSLP (thymic stromal lymphopoitin). L'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-9 produites par ces cellules renforcent la réponse immunitaire de type Th2.

4. Les cellules effectrices de l'intestin

Les éosinophiles sont les principales cellules effectrices des muqueuses intestinales. Ces cellules contribuent à l'initiation des réponses immunitaires via l'expression de TLR (Toll-like receptors) et des récepteurs Fc α R (IgA) et Fc γ RII (IgG) (Travers and Rothenberg, 2015). Elles interviennent notamment dans d'autres allergies non-IgE. Les éosinophiles libèrent lors de leur activation des médiateurs contenus dans leurs granules comme les MBP (Major Basic Protein) qui représente plus de 50% du contenu des granules, l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein) ou l'EPO (Eosinophil Peroxidase). Ces médiateurs induisent d'une part, l'activation et la migration des cellules dendritiques dans les ganglions mésentériques (Chu et al., 2014) et d'autre part, la survie et l'activation des mastocytes (Piliponsky et al., 2002). Les éosinophiles libèrent également des cytokines capables d'accentuer les réponses Th2 au niveau local comme l'IL-4 ou l'IL-13.

5. Mécanismes de mise en place et de régulation des réponses aux antigènes alimentaires

Pour la plupart des individus, les protéines alimentaires induisent une tolérance immunitaire permettant l'absorption des nutriments sans provoquer de réaction inflammatoire. La rupture ou le manque d'induction de cette tolérance chez les individus atopiques entraînent une sensibilisation pour un ou plusieurs allergènes alimentaires et le développement de l'allergie.

a. Réponse normale à un aliment : l'induction de tolérance

La première description de la tolérance orale a été réalisée en 1911 par Wells et Osborne. Elle est définie par une non-réponse du système immunitaire aux antigènes qui traversent le tractus digestif. La tolérance est en fait un processus actif : des cellules suppressives sont générées pour empêcher une réponse immunitaire inappropriée. La principale population de cellules régulatrices est les lymphocytes T régulateurs générés dans le tractus digestif par une population spécialisée de cellules dendritiques.

i. Rôle des DC de l'intestin pour l'induction de tolérance orale

Les cellules dendritiques présentes dans les muqueuses intestinales ont un rôle déterminant pour la sensibilisation à un allergène ou l'induction de tolérance. L'induction de tolérance commence par la migration des DC CD103+ CD11c+ dans les ganglions mésentériques (MLN) grâce à l'expression du CCR7 (Worbs et al., 2006). Les DC CD103+ isolés des MLN vont alors provoquer d'une part l'anergie ou la délétion des lymphocytes CD4+ et CD8+ spécifique de l'antigène (Dubois et al., 2009) et d'autre part induire préférentiellement la génération de lymphocytes Treg CD4+ FoxP3+. Ces DC produisent l'enzyme RALDH2 qui transforme le rétinal en acide rétinoïque (RA). L'acide rétinoïque ainsi que la sécrétion de cytokines immunsuppressives telles que le TGF- β vont favoriser la différenciation des lymphocytes naïfs en lymphocytes T régulateurs (Coombes et al., 2007). D'autres molécules sont également impliquées dans le développement de Treg comme des enzymes produites par les DC (Matteoli et al., 2010), ou des molécules de co-stimulation telles que B7 (Fukaya et al., 2010). L'acide rétinoïque induit également l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du CCR9 par les lymphocytes aboutissant à leur recirculation vers la lamina propria de l'intestin (Benson et al., 2007). La RA et l'IL-6 stimulent aussi la production d'IgA par les lymphocytes B de la lamina propria qui neutralisent les antigènes. D'autres APC peuvent également participer à l'induction de tolérance notamment les macrophages capables d'induire des cellules Treg par la production d'IL-10 et de TGF β (Denning et al., 2007).

ii. Rôle des lymphocytes T régulateurs pour l'induction de tolérance

Le rôle essentiel des lymphocytes T régulateurs (Treg) pour le contrôle des réactions allergiques a été démontré par des études de délétion et d'inactivation des Treg. Le rôle des Treg a également été étudié par le transfert, dans des animaux naïfs, de cellules suppressives induites à la suite d'une stimulation antigénique, aboutissant à la prévention des symptômes et à l'inhibition de la réponse IgE (Frossard et al., 2004; Yamashita et al., 2012).

Trois sous-groupes de cellules CD3+ CD4+ Treg ont été décrits : les Treg CD4+ CD25+ FoxP3+ provenant du thymus, appelés aussi les Treg thymiques (tTreg), les Treg périphériques (pTreg) et les Treg induits *ex-vivo* (iTreg) (Shevach and Thornton, 2014). Les pTreg sont générés dans les zones périphériques à partir de lymphocytes T effecteurs et peuvent être

des Treg FoxP3+ ou des Treg CD4+ FOXP3-/+ producteurs d'IL-10 (Tr1) ou des cellules Th3 sécrétant du TGF- β ou des CD8+ Treg. Enfin, des Treg peuvent être induits in vitro : les iTreg. L'expression de FoxP3 est suffisante pour convertir des lymphocytes T naïfs CD4+ CD25- en lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ et cette conversion peut être induite par le TGF-â (Chen et al., 2003).

L'activité régulatrice des Treg s'exprime par différents mécanismes de suppression comme la production de cytokines suppressives (IL-10, TGF- β) ou l'expression de molécules de surface (CTLA-4). Ces molécules peuvent supprimer directement ou indirectement l'activation des cellules impliquées dans les réactions allergiques telles que les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques et les cellules effectrices ce qui favorise les lymphocytes B à produire des IgG4 et inhibent la production d'IgE (Meiler et al., 2008). Les Treg peuvent également induire des DC tolérogéniques ou inhiber la maturation des cellules dendritiques en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 à la surface des DC (Wing et al., 2008). De plus, la production de cytokines par les Treg bloque l'afflux des éosinophiles et des lymphocytes T effecteurs dans les tissus inflammés (Ring et al., 2006). Les Treg empêchent aussi l'activation des mastocytes et des basophiles en diminuant l'expression du Fc ϵ RI et annulent la dégranulation de ces cellules par des interactions OX40-OX40L (Gri et al., 2008).

Bien que les tTreg ne semblent pas nécessaire à l'induction de tolérance (Mucida et al., 2005), les pTreg FoxP3+ sont quant à eux indispensables. En effet, la délétion transitoire des cellules FoxP3+ dans un modèle de souris Dereg conduit à la perte de la tolérance orale (Hadis et al., 2011). D'autres études démontrent un défaut d'activation des Treg aboutissant par l'absence de régulation à une activation des lymphocytes Th2 (Magnan and Humbert, 2005). Les Treg sont donc indispensables à l'induction de tolérance orale et une anomalie qualitative ou quantitative de ces cellules entraîne une sensibilisation à l'allergène alimentaire.

b. La sensibilisation à un allergène alimentaire

La sensibilisation à un allergène alimentaire résulte d'un défaut d'induction de tolérance pouvant être causé par de nombreux facteurs. Bien que des prédispositions génétiques

contribuent fortement au risque de développer une allergie alimentaire, des facteurs environnementaux peuvent accroître ce risque.

Plusieurs expériences ont confirmées que la sensibilisation à un allergène peut s'effectuer par voie orale. Chez l'homme et la souris, des traitements médicamenteux par voie orale ont aggravé la sensibilisation à des antigènes alimentaires (Schöll et al., 2005; Untersmayr et al., 2003). La présence d'adjuvant influence aussi la sensibilisation aux allergènes. L'administration de toxines bactériennes accentue la production d'IL-33 par les cellules épithéliales de l'intestin (Chu et al., 2013) et augmente l'expression d'OX40L par les DC CD103+ (Blázquez and Berin, 2008) ce qui conduit à la migration des cellules dendritiques dans les ganglions et à la polarisation Th2. De plus, les toxines bactériennes activent et provoquent la dégranulation des éosinophiles résidents de l'intestin. Les molécules libérées lors de la dégranulation déclenchent des modifications des cellules dendritiques et des dommages tissulaires contribuant à la sensibilisation (Chu et al., 2014). Certains adjuvants suppriment également les mécanismes de régulation nécessaires à la tolérance. Par exemple, les anticorps anti-CTLA-4 inhibent la fonction des lymphocytes T régulateurs (van Wijk et al., 2005).

i. Le rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est l'ensemble de la population de microorganismes vivant au sein du tractus digestif en symbiose avec l'hôte. Il est composé d'environ 10^{14} bactéries entretenant une relation d'équilibre l'organisme. La composition du microbiote intestinal est différente chez chaque individu et dépend de divers facteurs liés à l'individu (génétique, âge, état de santé), à son régime alimentaire et à son environnement (contamination par des pathogènes, prise d'antibiotiques, climat, stress, etc.). Les bactéries du microbiote ont un rôle dans la protection contre certains pathogènes, dans la digestion et dans la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses.

La colonisation de l'intestin par les bactéries constituant le microbiote se produit à la naissance. La composition du microbiote des enfants nés par césarienne est différente de celle des enfants nés par voie basse (Bager et al., 2008) modifiant la susceptibilité de développer des allergies alimentaires. Le microbiote intestinal se développe aussi en fonction de la nutrition : un régime alimentaire varié pendant les premières années permet

de limité les risques de développer une allergie alimentaire (Roduit et al., 2014). L'importance du microbiote intestinal pour l'induction de tolérance ou la sensibilisation à un allergène a été démontrée en observant des souris sans microbiote. En effet, ces souris ont un taux plus élevé d'IgE et la reconstitution du microbiote peu après leur naissance permet de supprimer ces IgE (Hill et al., 2012). La diversité du microbiote semble aussi avoir une importance pour prévenir des allergies alimentaires (Ling et al., 2014) et l'effet protecteur de certaines espèces de bactéries a été mis en évidence. Par exemple, les bactéries Clostridium permettent l'expansion des lymphocytes T régulateurs dans l'intestin (Atarashi et al., 2011). Cette diversité permet d'étendre la diversité du répertoire des lymphocytes T régulateurs au sein du tractus digestif.

ii. La barrière épithéliale

La barrière intestinale joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'intestin. En effet, les jonctions étroites entre les entérocytes et la dégradation intracellulaire par les enzymes du lysosome empêchent les bactéries et les allergènes d'accéder à la lamina propria. Cependant, lors d'une réaction allergique, une augmentation de la perméabilité intestinale a pu être mise en évidence *in vitro* et chez des patients (Xiao et al., 2011). Cette rupture de la barrière intestinale est due aux cytokines de type Th2 produites lors d'une réponse allergique. Par exemple, des études montrent que l'IL-4 et l'IL-13 augmentent le flux de bactéries et de macromolécules à travers une couche de cellules épithéliales humaines mise en culture (Di Leo et al., 2002) (Ceponis et al., 2000). D'autres études montrent que l'IL-13 peut également induire l'apoptose de ces cellules épithéliales (Heller et al., 2005). La tryptase et le TNF- α produits par les mastocytes ont également été mis en évidence pour modifier les jonctions entre les cellules épithéliales et ainsi augmenter la perméabilité de la barrière intestinale (Jacob et al., 2005).

D'autre part, certaines protéines alimentaires modifient l'expression des cytokines des cellules épithéliales telles que la galectin-9, l'IL-25, l'IL-33 ou la TSLP (thymic stromal lymphopoitietin) qui agissent sur les cellules dendritiques et favorisent la sensibilisation à l'allergène (Chen et al., 2011). En effet, TSLP active l'expression du ligand de OX40 sur les cellules dendritiques conduisant à une réponse Th2 (Blázquez and Berin, 2008). TSLP stimule également la prolifération des basophiles qui participent à l'inflammation (Siracusa et al.,

2011). Par ailleurs, l'IL-25 et l'IL-33 activent les cellules ILC2 productrices de cytokines pro-Th2 (Salimi et al., 2013).

Les cellules épithéliales produisent aussi du GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) qui stimule la prolifération, la maturation et la fonction des cellules dendritiques et des macrophages. La surexpression du GM-CSF par les cellules épithéliales facilite la sensibilisation aux allergènes en augmentant la production d'IL-33 et en activant l'expression d'OX40L par les cellules dendritiques (Llop-Guevara et al., 2014).

III. Immunothérapie de l'allergie

Le traitement de l'allergie nécessite de s'attaquer à la fois à ses symptômes et à ses causes.

Aujourd'hui, il existe trois traitements pour contrôler l'allergie :

- L'éviction de l'allergène nécessite la stricte élimination de la consommation des allergènes responsables de l'allergie alimentaire. Cependant, cette pratique demande une parfaite identification des allergènes qui peuvent être compliqués à diagnostiquer.
- Les traitements symptomatiques limitent les symptômes de l'allergie mais n'interviennent pas sur la cause. Ils sont utilisés quel que soit l'allergène. Les traitements existants sont prescrits en fonction des organes atteints et de la sévérité des manifestations cliniques. Parmi ces traitements, on peut citer les antihistaminiques s'opposant aux effets de l'histamine ; les inhibiteurs de dégranulations ; et les anti-inflammatoires. Cependant, tous ces médicaments sont utilisés pour contrôler les effets des allergies provoquant de l'asthme mais seuls les antihistaminiques peuvent être utilisés en cas d'allergies alimentaires.
- La désensibilisation ou immunothérapie spécifique de l'allergène (ITS).

1. L'ITS ou désensibilisation

L'ITS vise à induire un état de tolérance de l'organisme vis-à-vis de l'allergène pour réduire l'intensité des symptômes liés à l'exposition à cet allergène. Contrairement aux traitements symptomatiques qui atténuent les symptômes et réduisent l'inflammation, l'ITS est à l'heure actuelle le seul traitement permettant de guérir de certaines allergies. Ce traitement consiste à soumettre l'organisme à des doses croissantes d'extraits allergéniques. L'ITS par voie sous-cutanée existe depuis 1911, année durant laquelle une série de découvertes faites par les scientifiques Noon et Freeman vont conduire au concept de désensibilisation ou immunothérapie. Bien qu'il s'agisse d'une thérapie ancienne, ce n'est que récemment que les mécanismes d'action ont commencé à être clarifiés.

Ainsi, l'immunothérapie spécifique diminue, au niveau du sérum, la quantité d'anticorps IgE et augmente les anticorps IgG spécifiques de l'allergène, plus particulièrement les IgG4 connus pour neutraliser l'allergène (Akdis et al., 1998). L'ITS réoriente aussi la différenciation

des lymphocytes T CD4+ de type Th2 en lymphocyte T CD4+ de type Th1 (sécrétions d'IL-12 et d'IFN γ) et induit une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs (CD4+, CD25+, FoxP3+) qui inhibent les réponses contre l'allergène (Pereira-Santos et al., 2008). L'ITS réduit également le nombre et l'état d'activation des basophiles et mastocytes (Jutel et al., 1996).

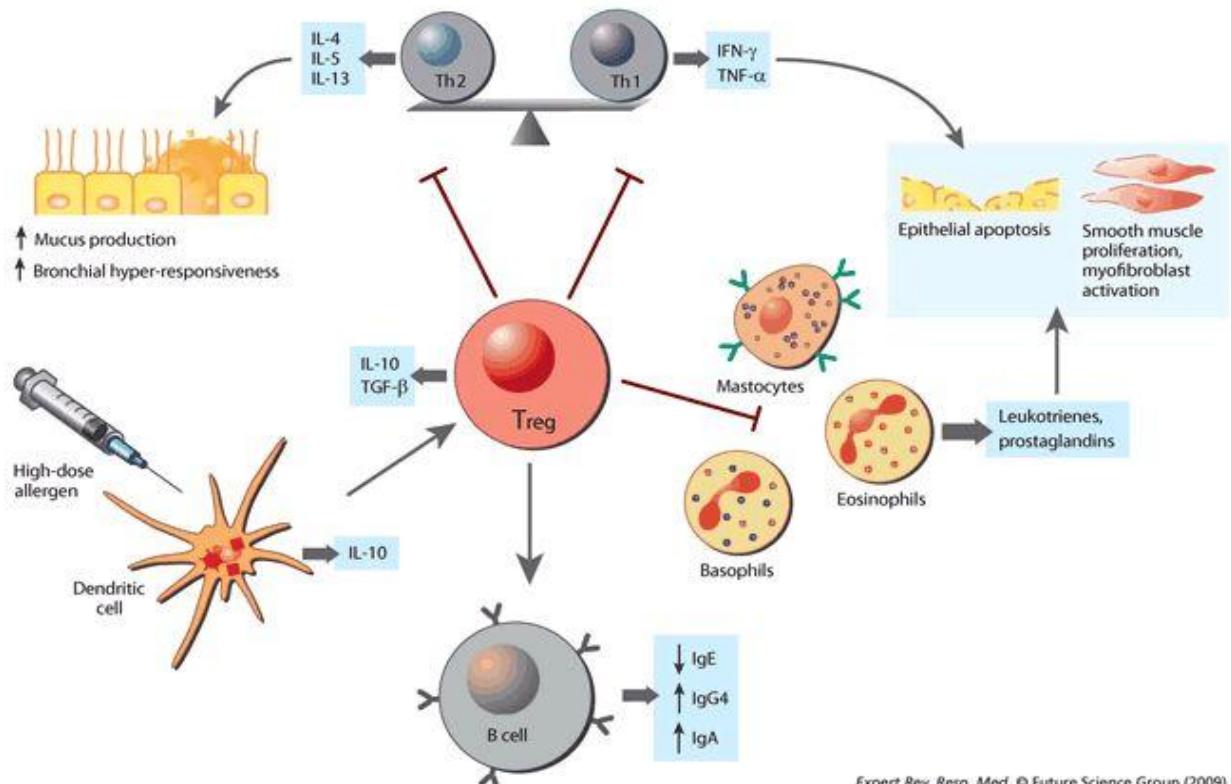


Figure 5 : Schéma du mécanisme d'action de l'immunothérapie spécifique.

Néanmoins, l'ITS par voie sous-cutanée (SCIT) présente encore des inconvénients, notamment le risque de chocs anaphylactiques. C'est pourquoi les études concernant l'ITS par voie sous-cutanée dans le cadre des allergies alimentaires ont rapidement été abandonnées.

D'autres voies d'administration de l'ITS ont également été étudiées notamment les voies muqueuses qui sont un environnement propice à la tolérance grâce à la génération de lymphocytes T capables de s'activer préférentiellement contre des antigènes étrangers potentiellement dangereux (Maynard et al., 2009). Les administrations peuvent se faire par voie nasale, orale et sublinguale. L'efficacité des administrations par voie sublinguale (SLIT) a été montrée dans des modèles d'allergies respiratoires (Frati et al., 2007). Elles permettent

aujourd’hui de traiter la rhinite et l’asthme. Des essais cliniques utilisant la SLIT pour traiter des allergies alimentaires sont en cours et concernent principalement les allergies aux arachides (Chiang and Berin, 2015). Cependant, l’efficacité de la SLIT pour ce type d’allergie reste encore à démontrer.

L’induction de tolérance par voie orale dans des modèles d’allergies alimentaires semble être une approche prometteuse pour l’immunothérapie. En effet, l’administration orale d’allergène alimentaire à une faible dose et répétée quotidiennement induit une tolérance locale vis-à-vis de l’allergène au niveau des muqueuses (Niggemann et al., 2006). Des essais cliniques montrent une efficacité de la désensibilisation par voie orale pour les allergies au lait, à l’œuf ou encore aux arachides. Cependant, le risque pour les patients de développer des réactions sévères associées au traitement reste fort (Vazquez-Ortiz et al., 2014). En effet, le risque que l’allergène se fixe sur les IgE reste présent, c’est pourquoi il est nécessaire de trouver une formulation de l’antigène permettant de le masquer tout en induisant une bonne réponse immunitaire et de réorienter celle-ci vers une réponse de type Th1 favorisant la production de T régulateurs.

Dans ce contexte, des recherches sur différentes voies d’administration et sur différents mode de délivrance de l’allergène sont en cours. Par exemple, la voie épicutanée présente l’intérêt de favoriser la prise en charge de l’allergène par les cellules de Langerhans résidentes (Senti et al., 2015). L’utilisation de nanoparticules pour vectoriser l’allergène est également en cours d’étude (Gamazo et al., 2014). D’autres approches d’immunothérapie non spécifiques utilisent des probiotiques afin d’exprimer en excès certaines cytokines anti-inflammatoires par le microbiote intestinal, ou encore des cytokines pour modifier certains compartiments cellulaires comme les lymphocytes T régulateurs.

2. Les VLP : vecteur de choix pour l’antigène dans l’immunothérapie

Dans notre laboratoire, nous avons développé une stratégie de vectorisation des antigènes qui repose sur l’utilisation de pseudo-particules rétrovirales, et qui peut répondre aux problématiques de l’ITS de l’allergie alimentaire évoquées précédemment.

a. Les pseudo-particules virales

Les pseudo-particules virales ou VLP (virus-like particles) sont des particules dont la structure et la taille sont semblables au virus sauvage. Lorsque les protéines de capsid du virus sont exprimées dans des cellules, les VLP se forment par auto-assemblage de ces protéines et sont libérées par bourgeonnement (Li et al., 1997). Ces particules vides, dépourvues de génome viral, sont capables d'induire une réponse immunitaire similaire au virus infectieux (Roy and Noad, 2009). L'absence de génome fait de ces particules, incapables de se répliquer, un outil de vaccination sûr utilisé dans des vaccins actuellement commercialisés : le vaccin contre le papillomavirus (HPV) et contre le virus de l'hépatite B (HBV). La nature dense et répétitive des VLP les rend particulièrement efficaces pour induire une bonne réponse anticorps sans ajout d'adjvant, ainsi qu'une forte réponse des lymphocytes T cytotoxiques contre les antigènes (Chackerian, 2007).

Il existe plusieurs type de VLP : les VLP homologues dont la protéine de structure est la même que celle du virus à l'état sauvage (exemple du HPV) ; les VLP hétérologues qui transportent des antigènes provenant d'un virus différent. Ces VLP présentent un intérêt en vaccination puisqu'il est possible d'insérer des antigènes dans la capsid de ces particules permettant ainsi d'utiliser les VLP comme plateforme antigénique.

b. Les rétroVLP : plateforme antigénique

Le laboratoire utilise des rétroVLP, c'est-à-dire des VLP dérivées du rétrovirus Murine Leukemia Virus (MLV) sur lesquelles sont ajoutés les antigènes d'intérêt. Le génome du rétrovirus MLV est bien connu. Le gène gag code pour la protéine de la capsid qui présente la capacité de s'auto-assembler dans la cellule pour former les rétroVLP (Andrawiss et al., 2003). Ces rétroVLP peuvent être utilisées comme plateforme antigénique puisqu'il est possible d'insérer des antigènes (Ag) d'intérêt dans la capsid de la particule, après ajout de la séquence antigénique en 3' de la séquence gag, autorisant l'expression d'une protéine de fusion chimérique Gag-Ag capable d'auto-assemblage.

Le laboratoire a également développé une stratégie dite plasmoVLP qui combine les avantages des rétroVLP et de la vaccination ADN connue pour induire une réponse Th1. Un plasmoVLP correspond au plasmide porteur des gènes codant les rétroVLP (Lescaille et al.,

2013). Les plasmoVLP sont exprimés par les cellules transfectées *in vivo* et permettent la production et la formation des rétroVLP directement par les cellules de l'organisme.

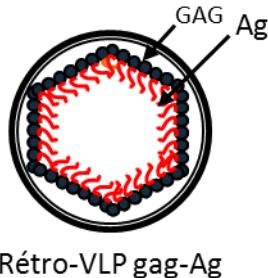


Figure 6 : Schéma d'une rétroVLP formée par la fusion des gènes codant pour la protéine gag du virus MLV et pour l'antigène d'intérêt.

c. Intérêt des rétroVLP en immunothérapie

Dans le cadre de l'immunothérapie anti-allergique, les immunisations par voie orale sont difficiles du fait des nombreux obstacles pouvant freiner la délivrance de l'antigène tels que le pH de l'estomac, les enzymes du tractus digestif ou encore la barrière physique associée à la surface de la muqueuse elle-même. Dans un tel contexte, les rétroVLP présentent un intérêt dans la protection de l'antigène par son encapsidation et elles sont maintenant étudiées pour l'immunothérapie de l'allergie (Huret et al., 2013). L'antigène encapsidé est protégé de la reconnaissance par les IgE supprimant les risques d'effets secondaires graves comme les chocs anaphylactiques. De plus, leurs propriétés immunogènes naturelles font qu'elles sont facilement captées par les cellules dendritiques ; or, de récentes études ont montré que les CPA de la lamina propria de l'intestin grêle ont la capacité d'induire le développement de lymphocytes T régulateurs qui jouent un rôle important dans la tolérance (Maynard et al., 2009). Les recherches effectuées par notre équipe ont également permis de comprendre que les rétroVLP sont capables d'activer les cellules dendritiques et d'orienter les réponses immunitaires vers un profil de type Th1.

OBJECTIFS DU STAGE

Objectifs de mon stage

Une stratégie d'immunothérapie par voie orale dans un modèle d'allergie alimentaire est en cours d'évaluation par notre équipe. L'immunisation préventive de souris est pratiquée en utilisant la stratégie plasmoVLP portant l'antigène. Le premier objectif de mon stage est d'améliorer les effets thérapeutiques des plasmo-VLP par la co-administration de plasmides codant pour des cytokines immunorégulatrices IL-2 et IL-10.

En parallèle, nous nous intéressons aux mécanismes immunologiques associés à l'immunothérapie par les plasmo-VLP. Nous cherchons à identifier les cellules impliquées dans la prise en charge de l'antigène au niveau des muqueuses de l'intestin grêle après administration des rétroVLP.

Principe expérimental

Pour évaluer l'effet thérapeutique des plasmo-VLP avec les plasmides pIL2 et pIL10, nous utilisons un modèle d'allergie alimentaire à l'ovalbumine (OVA) établi par Yamashita et al. (Yamashita et al., 2012) modifiant la dose et la fréquence d'administration. Des souris BALB/c sont immunisées en préventif avec des plasmoVLP Gag-OVA portant l'antigène spécifique de l'œuf puis sont sensibilisées à l'ovalbumine par deux administrations intrapéritonéales (ip) d'OVA en présence d'alum (adjuvant pro-TH2). L'allergie alimentaire est déclenchée plus tard par des administrations orales d'OVA et elle est quantifiée par l'évaluation du score clinique. Le score clinique prend en compte les diarrhées et l'aspect du pelage, il est confirmé par la chute de température rectale.

L'immunothérapie des plasmo-VLP Gag-OVA co-administrés avec pIL2 ou pIL10 est évaluée dans un traitement préventif, c'est-à-dire par l'administration orale des plasmides pendant cinq jours avant la sensibilisation à l'ovalbumine.

En plus de l'évaluation clinique, une analyse par cytométrie en flux des cellules de l'intestin, des plaques de Peyer et des ganglions drainants est réalisée. D'autre part, l'activation et la dégranulation des basophiles sont également analysées.

Dans le cadre de la stratégie d'immunothérapie, le deuxième objectif de mon stage consiste à identifier les mécanismes de prise en charge des VLP par les cellules de l'intestin. Pour

observer les cellules qui captent les pseudo-particules virales, nous utilisons des rétroVLP rendues fluorescentes par la fusion de Gag à la GFP (Green Fluorescent Protéine). Ces deux outils sont utilisés dans un modèle *in vivo* après gavage des souris avec les VLP fluorescentes ou l'ovalbumine AF488 ou après injection de ces antigènes dans le duodénum de l'intestin. Afin d'observer la capture de l'antigène, les cellules des intestins, après traitement, sont analysées en cytométrie de flux ou observées au microscope confocal après l'immunomarquage des tissus.

En contrôle, nous utilisons de la protéine OVA couplée à l'Alexa Fluor 488 qui est un fluorochrome vert alternatif à la GFP dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont proches de celles de la GFP.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes

I. Préparation des plasmides

Des bactéries, préalablement transformées avec les plasmides d'intérêt (pGagOVA, pORF9-mIL10, pORF-mIL2, pncDNA et pGagGFP), sont étalées sur une gélose LB (Lennox L agar, *Invitrogen*) contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL) et incubées toute la nuit à 37 °C. Une colonie est prélevée et mise en culture dans 2 mL de TB (terrific Broth, *Invitrogen*) avec ampicilline (100 μ g/mL) pendant 8 heures, à 37 °C et sous agitation. 250 μ L de cette suspension sont prélevés et dilués dans 250 mL de TB, avec ampicilline, puis incubés pendant 12 à 16 heures à 37 °C sous agitation.

La suspension est centrifugée et l'ADN plasmidique contenu dans le culot bactérien est extrait par le kit «NucleoBond PC 2000 Endotoxine Free» (*Macherey-Nagel*).

Les ADN purifiés sont repris en eau stérile puis dosés au Nanodrop pour déterminer leur concentration et la pureté de la préparation. La vérification de l'intégralité du plasmide produit s'effectue par digestions enzymatiques et les préparations de plasmides sont aliquotées et conservées à -20 °C.

II. Culture cellulaire et production de rétroVLP

Les cellules utilisées sont des lignées de cellules adhérentes HEK 293T (cellules humaines embryonnaires de rein). Elles sont cultivées en milieu de culture DMEM complété par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1000 unités de pénicilline, 1000 μ g de streptomycine et 2,92 mg/mL de glutamine (DMEM complet). Ces cellules sont incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂.

Les cellules HEK 293T sont ensemencées la veille à 15 millions de cellules par flasque de 175 cm², dans 25 mL de milieu de culture DMEM complet. Le lendemain, elles sont transfectées avec les plasmides pXD05 par la méthode au phosphate de calcium. Le plasmide pXD05 code pour la protéine Gag, permettant la formation de la capsid chez les rétrovirus MLV. Ce plasmide code également pour la protéine GFP qui est fusionnée à Gag.

Pour une flasque, 50 μ g d'ADN sont ajoutés à 2,2 mL de TE 0,1X (Tris EDTA) et précipités en ajoutant goutte à goutte et sur vortex 300 μ L de chlorure de calcium. Cette préparation est

ensuite ajoutée, dans les mêmes conditions, à 2,5 mL d'une solution tampon d'HBS 2X (Hepes Buffer Saline). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est ajouté au milieu de culture des cellules HEK 293T. 16 à 18 heures plus tard, le milieu est remplacé par 17 mL de milieu DMEM contenant la pénicilline, la streptomycine et la glutamine mais sans SVF.

Les cellules transfectées avec les plasmides produisent alors des rétroVLP, libérées par la suite dans le milieu de culture. Après 48 heures, le surnageant des cellules est prélevé, filtré et concentré afin d'obtenir une solution purifiée de rétroVLP. La concentration et la purification du surnageant filtré s'effectue en deux étapes : d'abord à l'aide de centricons (centricon Plus-70, *Millipore*), puis par ultracentrifugation à 25000 RPM pendant 2 heures sur un gradient de sucre 30-50 (30 % et 50 % de sucre dilué en eau stérile). L'interface des deux concentrations de sucre comprenant les rétro-VLP est récupérée et lavée en eau. Après une deuxième ultracentrifugation, les culots de rétroVLP sont repris en PBS 1X et leur concentration est déterminée par la méthode BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, *Thermo scientific*).

III. Western Blot

Les rétroVLP produites et purifiées sont vérifiées par la technique de Western Blot. 5 µg de rétroVLP sont dénaturés par chauffage à 95 °C pendant 5 minutes dans du tampon (NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, *Invitrogen*) contenant un agent réducteur (NuPAGE Sample Reducing 1X, *Invitrogen*). Une migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (NuPAGE SDS-PAGE Gels, *Invitrogen*) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. La migration s'effectue en tampon de migration (MOPS SDS Running 1X, *Invitrogen*) pendant 10 minutes à 150 V, puis 45 minutes à 200 V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (iBlot Transfer Stack PVDF regular, *Invitrogen*) par l'appareil iBlot Dry Blotting system (*Invitrogen*) pendant 7 minutes à 20 V.

Cette membrane est incubée 20 minutes à température ambiante (RT) en tampon de saturation (Blocking Buffer, *Invitrogen*), lavée en TBS 1X + 0,05 % tween (Wash Buffer, *Invitrogen*), puis incubée toute la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires anti-Gag ou anti-GFP. Le lendemain, la membrane est lavée en Wash Buffer puis incubée 1 heure à RT avec l'anticorps secondaire de l'espèce de l'anticorps primaire, couplé à la biotine. Après trois

lavages en Wash Buffer, la membrane est incubée 1 heure à RT avec une streptavidine couplée à un marqueur fluorescent (Qdot® 625 Streptavidin Conjugate, *Invitrogen*) avant d'être révélée sous UV.

IV. Animaux et modèle d'allergie alimentaire à l'ovalbumine

Les souris BALB/c (souche AnNRj) ont été obtenues à 7 semaines d'âge auprès des laboratoires Charles Rivers et JANVIER et ont été hébergées et manipulées dans le Centre d'Expérimentation et Formation de la Pitié-Salpêtrière dans des conditions EOPS et en accord avec la législation européenne sur l'expérimentation animale.

L'allergie alimentaire à l'ovalbumine a été induite chez des souris femelles BALB/c AnNRj : les souris ont été sensibilisées par deux injections intraperitoneales de 10 µg d'OVA (Ova A5503, grade V ; Albumin from chicken egg white, Sigma-Aldrich Co) formulé avec 500 µg de gel d'hydroxyde d'aluminium (AlOH3 2%, Invogen) à une semaine d'intervalle. Dix jours plus tard, toutes les souris ont été gavées 4 fois sur une semaine, avec 20 mg d'OVA dissous dans du PBS (volume total = 100 µL) afin d'induire l'allergie. L'allergie alimentaire a été évaluée par un changement de la température rectale dont la mesure a été réalisée dans l'heure suivant le gavage oral en utilisant une sonde rectale (Bioseb, France). Les selles diarrhéiques (score 0 à 3) et le pelage hirsute (score 0 à 2) ont aussi été évalués quantitativement. Le score de sévérité allergique (score diarrhée + score du pelage) est représenté sur un score maximal de 5.

Les souris sont traitées en préventif pendant 5 jours avec 50 µg ou 100 µg de plasmoVLP Gag-OVA par jour et 50 µg de plasmides pIL2 ou pIL10 ou pncDNA. L'ADN plasmidique est formulé en PEI (polyéthylèneimine) et administré par voie orale.

V. Validation de la transfection *in vivo* des plasmides

Les tests de transfection *in vivo* par voie orale ont été réalisés après gavage des souris par 150µg d'un plasmide codant pour la luciférase (pLuc) ou 200µL de PBS. Six heures et 24h après le gavage, 100µL de luciférine ont été administrées par voie ip aux souris et une acquisition de la bioluminescence sur Xenogen IVIS® Spectrum (AMV Europe) a été réalisée après anesthésie des rongeurs. Le traitement des données a été réalisé sous Living Image® 4.4 (Caliper Life Sciences).

VI. Capture de l'antigène : modèle in vivo

Intestins

Trois groupes de souris sont traités avec :

- du PBS,
- 100 µg d'ovalbumine conjuguée à l'Alexa Fluor 488,
- ou différentes doses de rétroVLP-GFP (50-100-200-300µg).

Ces trois préparations sont administrées par gavage ou injectées dans le duodénum des intestins de souris préalablement anesthésiées.

Plusieurs heures après administration (1, 2, 5 ou 12 heures), les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les intestins, les rates ainsi que les ganglions mésentériques sont prélevés. Les rates, les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont digérés comme décrit précédemment. Les intestins sont coupés dans la longueur, puis en gros morceaux de 1 à 2 cm et incubés avec 5 mM de DTT afin d'éliminer le mucus. Enfin, les tissus de la lamina propria sont digérés avec les enzymes Collagénase IV (1 mg/mL) et DNase (0,4 mg/mL). Les cellules sont passées à travers un filtre en Nylon de 70 µm (*BD Falcon*) et centrifugées 5 minutes à 1500 RPM. Le culot est repris en PBS contenant 40 % de Percoll (*Sigma*), déposé délicatement sur du Percoll 80 % et centrifugées 20 minutes à 2000 RPM sans frein à 20 °C. Les cellules vivantes sont récupérées au niveau de l'interface, lavées en PBS, SVF 5 % et centrifugées 5 minutes à 1500 RPM. Les cellules sont reprises et traitées selon le protocole de cytométrie en flux.

Poumons

Deux groupes de souris sont traitée avec :

- du PBS,
- 50 µg de rétroVLP-GFP.

Ces préparations sont administrées par injections intranasales.

Trois, 24 ou 72 heures après injection, les souris sont anesthésiées et des lavages broncho-alvéolaires sont réalisés avec du PBS. Les souris sont ensuite perfusées en PBS et les poumons sont récupérés et digérés avec les enzymes libérase TM (0.3 WÄ%nsch units, ROCHE) et DNase (0,4 mg/mL). Les cellules sont passées à travers un filtre en Nylon de 70 µm et centrifugées 5 minutes à 1500 RPM. Le culot est repris en PBS contenant 40 % de Percoll,

déposé délicatement sur du Percoll 80 % et centrifugé 20 minutes à 2000 RPM sans frein à 20 °C. Les cellules vivantes sont récupérées au niveau de l'interface, lavées en PBS, SVF 5 % et centrifugées 5 minutes à 1500 RPM. Les cellules sont reprises et traitées selon le protocole de cytométrie en flux.

VII. Préparation des cellules immunitaires

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les rates, les plaques de Peyer ainsi que les ganglions mésentériques sont prélevés. Les rates sont dilacérées entre deux lames et les globules rouges sont lysés par le tampon ACK. Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont digérés en milieu RPMI 20 % SVF contenant les enzymes collagénase IV (1 mg/mL) et DNase (0,4 mg/mL). Les cellules sont reprises et traitées selon le protocole de cytométrie en flux.

Pour réaliser le test d'activation des basophiles et mastocytes, 200 µL de sang sont prélevés à la joue sur chaque souris et les globules rouges sont lysés à l'eau pendant 10 secondes. Les cellules sont ensuite incubées pendant une heure à 37 °C en milieu RPMI seul ou contenant 1 mg d'ovalbumine ou contenant un anticorps anti-IgE. Les cellules sont reprises et traitées selon le protocole de cytométrie en flux.

VIII. Cytométrie en flux

Environ deux millions de cellules par marquage de chaque organe sont mis en plaque 96 trous, centrifugés 2 minutes à 2000 RPM, re-suspendus avec 200 µL de PBS 5 % SVF puis centrifugés à nouveau. Le culot cellulaire est re-suspendu dans une solution de PBS contenant du 2.4G2 permettant la saturation des récepteurs Fc, et incubé 15 minutes à 4°C. Après centrifugation et lavage au PBS 5 % SVF, les cellules sont reprises dans une solution contenant un mélange d'anticorps pendant 25 minutes à 4 °C (Annexe 1).

Deux mélanges d'anticorps sont utilisés pour identifier les populations de cellules possiblement touchées par l'immunothérapie :

- le premier permet d'identifier les lymphocytes B grâce aux anticorps CD19 (marqueur des lymphocytes B), IgD et IgM (marqueurs des LB mémoires) et IgE ;
- le second permet d'identifier les lymphocytes T avec les anticorps CD3 (marqueur des lymphocytes T), CD4 (marqueur des LT CD4), CD8 (marqueur des LT CD8), CD25 et

FoxP3 (marqueur des lymphocytes Treg), ICOS (marqueur des LT activés) et KI67 (marqueur de prolifération cellulaire).

Un mélange d'anticorps est utilisé pour identifier les mastocytes et basophiles :

- les anticorps CD45 (marqueur des leucocytes), Fc ϵ RI, c-kit, CD11b et IgE vont permettre d'identifier les basophiles et les mastocytes. Les anticorps CD63 et CD200R sont utilisés pour déterminer l'état d'activation et de dégranulation de ces cellules.

Deux mélanges d'anticorps sont utilisés pour identifier les populations de cellules qui captent les rétro-VLP fluorescentes dans l'intestin :

- le premier permet d'identifier les populations de cellules dendritiques et de macrophages en utilisant les anticorps CD45, IA/IE (marqueur du CMH de classe II), F4/80 et CD11b (marqueur des macrophages), CD11c et CD103 (marqueur des cellules dendritiques) ;
- le deuxième permet d'identifier les différentes populations de lymphocytes avec les anticorps CD45, CD3 (marqueur des lymphocytes T), CD4 (marqueur des lymphocytes T CD4), CD8 (marqueur des lymphocytes T CD8), B220 (marqueur des lymphocytes B), NK1.1 (marqueur d'un type de cellules NK).

Un mélange d'anticorps est utilisé pour identifier les populations de cellules qui captent les rétro-VLP fluorescentes dans les poumons :

- les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires sont identifiés par les anticorps CD11c, IA/IE, F4/80 et SiglecF. Les lymphocytes B par l'anticorps CD19. Tandis que CD11b, SiglecF et Ly6c vont permettre d'identifier les éosinophiles, les monocytes et les neutrophiles.

Les anticorps sont utilisés à une concentration finale de 1 μ g/mL. Les cellules sont analysées par un cytomètre en flux (LSR II, *BD Biosciences*) et les données sont analysées avec le logiciel Flowjo.

IX. Immunofluorescence

Des groupes de souris sont traités avec :

- du PBS,
- 100 μ g d'ovalbumine conjuguée à l'Alexa Fluor 488,

- ou différentes doses de rétroVLP-GFP (100-200-300 µg dans l'intestin ou 50 µg dans les poumons).

Ces trois préparations sont administrées par gavage ou injectées dans le duodénum des intestins de souris préalablement anesthésiées.

Une heure, trois heures ou cinq heures après l'administration, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et une partie du duodénum de l'intestin grêle, contenant une plaque de Peyer, est prélevée. Pour le prélèvement des poumons, les souris sont préalablement perfusées en PFA 4 %. Les organes sont congelés en OCT, isopentane et azote liquide pour réaliser des coupes fines au cryostat ou fixer ON en PFA 4 % et incubées en sucrose 30 % durant plusieurs jours pour réaliser des coupes au microtome.

D'une part, des coupes entre 6 et 8 µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (*Leica CM1100*). Les coupes d'intestins sont fixées sur une lame avec du formaldéhyde 4 % pendant 10 minutes, puis perméabilisées en Triton 0,3 % pendant 30 minutes. Les sites de fixation non spécifiques des anticorps sont neutralisés avec un tampon de blocage (solution de résilait 5 %) pendant une heure en chambre humide.

D'autre part, des coupes de 80 µm sont réalisées avec un microtome à congélation (*MICROM_HM450*). Les sites de fixation non spécifiques des anticorps sont neutralisés avec un tampon de blocage (0.1M Lysine) pendant 30 minutes à température ambiante.

Des anticorps sont ensuite utilisés pour identifier les rétroVLP, la protéine ovalbumine ou des cellules potentiellement capables de capter la protéine fluorescente et les rétroVLP :

- des anticorps primaires anti-GFP (chicken) et anti-Gag (rat) sont utilisés pour détecter les rétroVLP Gag-GFP. Des anticorps secondaires anti-chicken AF488 (fluorescence verte) et anti-rat AF594 (fluorescence rouge) reconnaissent les anticorps primaires.
- la protéine fluorescente ovalbumine est détectée avec un anticorps primaire anti-ova (rabbit) puis un anticorps secondaire anti-rabbit FITC (fluorescence verte).
- les cellules potentiellement capables de capter la protéine ovalbumine ou les rétroVLP sont identifiées avec les anticorps primaires anti-CD3 (marqueur des lymphocytes T), anti-CD11b (marqueur des cellules dendritiques et des macrophages), anti-F4/80 (marqueur des macrophages), anti-B220 (marqueur des lymphocytes B) et anti-M cells (marqueur des cellules M des plaques de Peyer). Tous

ces anticorps primaires ont un isotype de rat et sont reconnus par l'anticorps secondaire anti-rat AF594.

Les coupes d'intestins réalisées au cryostat sont incubées avec les anticorps primaires, dilués au 1/50^e, pendant 1 heure en chambre humide, puis incubées avec les anticorps secondaires utilisés dans les mêmes conditions. Les coupes d'intestins et de poumons réalisées au microtome sont incubées ON à 4 °C avec les anticorps primaires dilué au 1/250^e, puis incubées avec les anticorps secondaires dilué au 1/1000^e pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, toutes les coupes sont incubées avec du Hoechst, dilué au 1/3000^e, pendant 10 minutes, ce qui permet ensuite d'observer les noyaux des cellules. Les tissus sont observés au microscope confocal inversé (LEICA AOBS SP2).

RÉSULTATS

Résultats

I. Immunothérapie de l'allergie alimentaire

1. Modèle d'étude de l'allergie alimentaire

L'équipe a mis au point un modèle d'allergie alimentaire chez la souris. Pour ce faire des souris ont été sensibilisées à l'ovalbumine (OVA) par 2 injections intra-péritonéales de 10 µg d'OVA formulée avec 500 µg de gel d'hydroxyde d'aluminium (Alum) à une semaine d'intervalle (Fig. 7A). Une semaine plus tard, les souris sont gavées avec 20 mg d'OVA dissous dans 100 µL de PBS. Les gavages sont effectués tous les deux jours afin d'induire l'allergie. Quatre à six administrations sont requises pour observer l'apparition de symptômes cliniques caractéristiques de l'allergie alimentaire.

L'allergie alimentaire est évaluée et scorée suite à l'observation des selles diarrhéiques (score de 0 à 3) et du pelage hirsute (score de 0 à 2) (Fig. 7B et 7C). La température corporelle des animaux est également mesurée dans l'heure suivant le gavage en utilisant une sonde rectale. Comparées aux souris non sensibilisées (naïves), les souris sensibilisées à l'allergène OVA développent une diarrhée sévère avec un hérissement du poil caractéristique et une diminution significative de leur température corporelle, perdant en moyenne entre 2 et 3°C.

De façon intéressante, la chute de température a pu être corrélée à la concentration sérique en MCPT-1, médiateur de la dégranulation (Fig. 7D). On observe que les souris sensibles (ronds noirs) qui subissent des chutes de leur température corporelle ont une concentration sérique en MCPT-1 plus élevée que les souris naïves (ronds blancs).

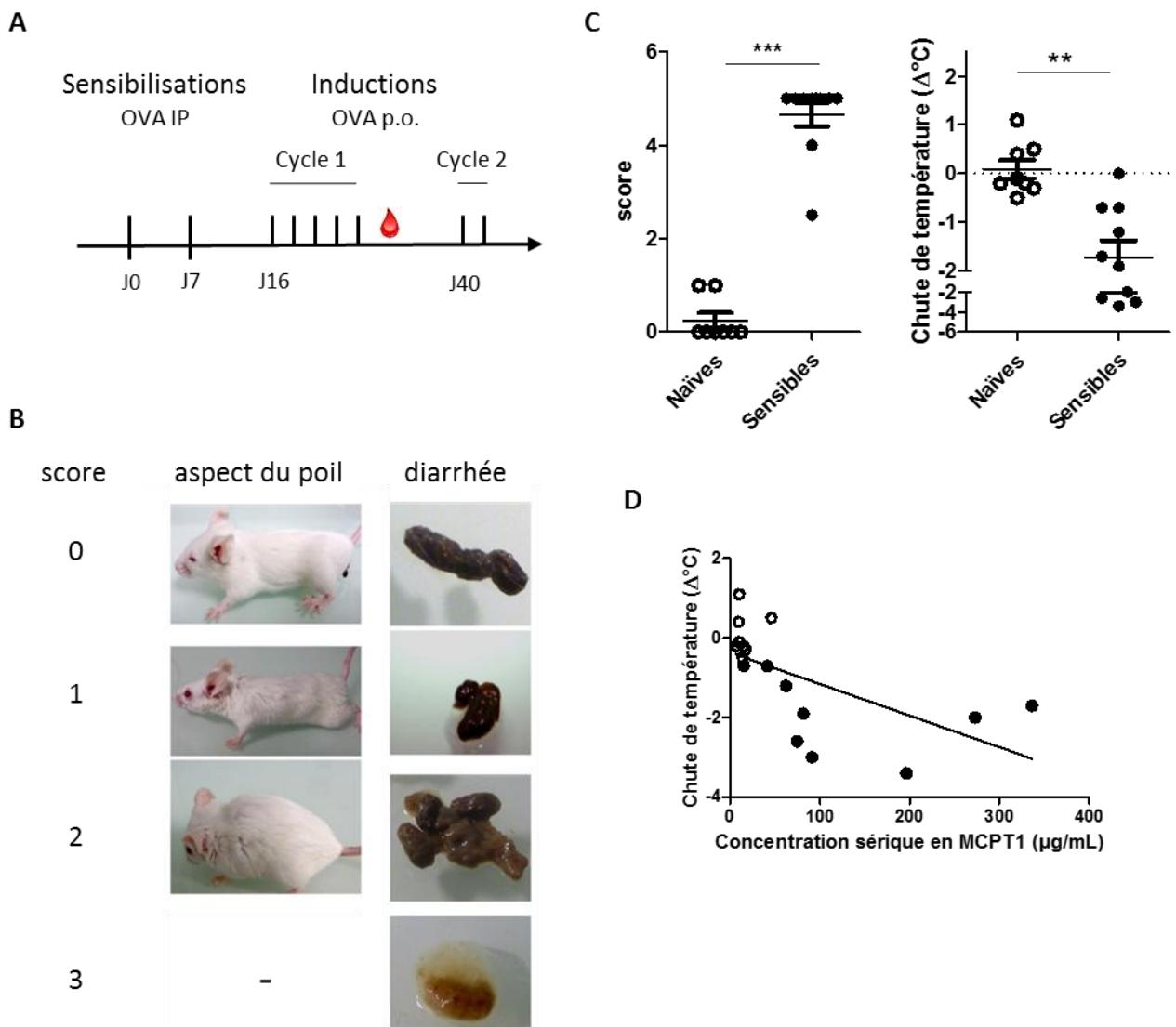


Figure 7 : Modèle d'étude de l'allergie alimentaire.

(A) Protocole expérimental. Les souris sont sensibilisées à l'ovalbumine par deux injections *i.p.* de 10 µg d'OVA+Alum à une semaine d'intervalle. L'allergie est initiée 7 jours plus tard par des cycles de gavage de 20 mg d'OVA tous les deux jours. (B) Evaluation des signes cliniques. Le score clinique est évalué après chaque gavage selon la gradation des symptômes et représenté par les photos. (C) Le score combiné et la moyenne des scores sont représentés par groupe. La température est mesurée avant et après l'induction, donnant un delta de température pour chaque souris. La moyenne des deltas de température est représentée par groupe. (D) Corrélation entre la concentration sérique de MCPT-1 et la chute de température pour les souris naïves (blanc) et les souris sensibles (noir).

2. Validation de la construction pVLP-Gag-OVA

Au sein du laboratoire, il a été développé un modèle de « vaccination tolérogène » basé sur l'administration d'ADN (pVLP-Gag-OVA) codant des pseudo-particules rétrovirales recombinantes vectorisant l'antigène OVA (Lescaillie et al., 2013). La bonne formation des VLP est vérifiée (Fig. 8A) *in vitro* après transfection de cellules HEK 293T avec le plasmide pVLP-Gag-OVA. La protéine de fusion Gag-OVA, produite par la cellule, va s'auto-assembler pour former les rétroVLP. Un Western Blot est réalisé à partir des surnageants purifiés par gradient de sucre (Fig. 8B). La protéine de fusion Gag-OVA est détectée par Western Blot en utilisant des anticorps anti-Gag et anti-OVA. La présence des bandes attendues à la taille de la protéine de fusion Gag-OVA à 105 KDa (Gag 60KDa + OVA 45 KDa), et ce sur les deux membranes révélées avec l'anti-Gag ou l'anti-OVA, nous indique que les rétroVLP contiennent bien la protéine chimérique Gag-OVA. On observe également la présence de formes clivées des protéines Gag-OVA (bandes 1, 2 et 3) mais aussi de la protéine ovalbumine seule (bande « ova » à 45kD). La présence de la protéine chimérique Gag-OVA nous permet donc de valider la construction du plasmide pVLP-Gag-OVA.

Nous avons développé une stratégie vaccinale utilisant le plasmide pVLP-Gag-OVA par voie orale. Le plasmide est formulé en PEI (Polyétherimide) qui permet la transfection des cellules *in vitro* et *in vivo*. Afin de déterminer *in vivo* la localisation de l'expression des plasmides administrés par voie orale, des souris sont gavées avec un plasmide codant pour la luciférase (pLuc) afin de procéder à un test de bioluminescence (Fig. 8C). En contrôle, des souris sont gavées avec du PEI seul. Nous avons pu détecter une augmentation de la bioluminescence 24 heures après administration et uniquement dans les souris traitées révélant la transfection des cellules par le plasmide pLuc. Toutefois, des analyses complémentaires sont requises pour confirmer et localiser plus précisément l'expression au niveau du tractus digestif.

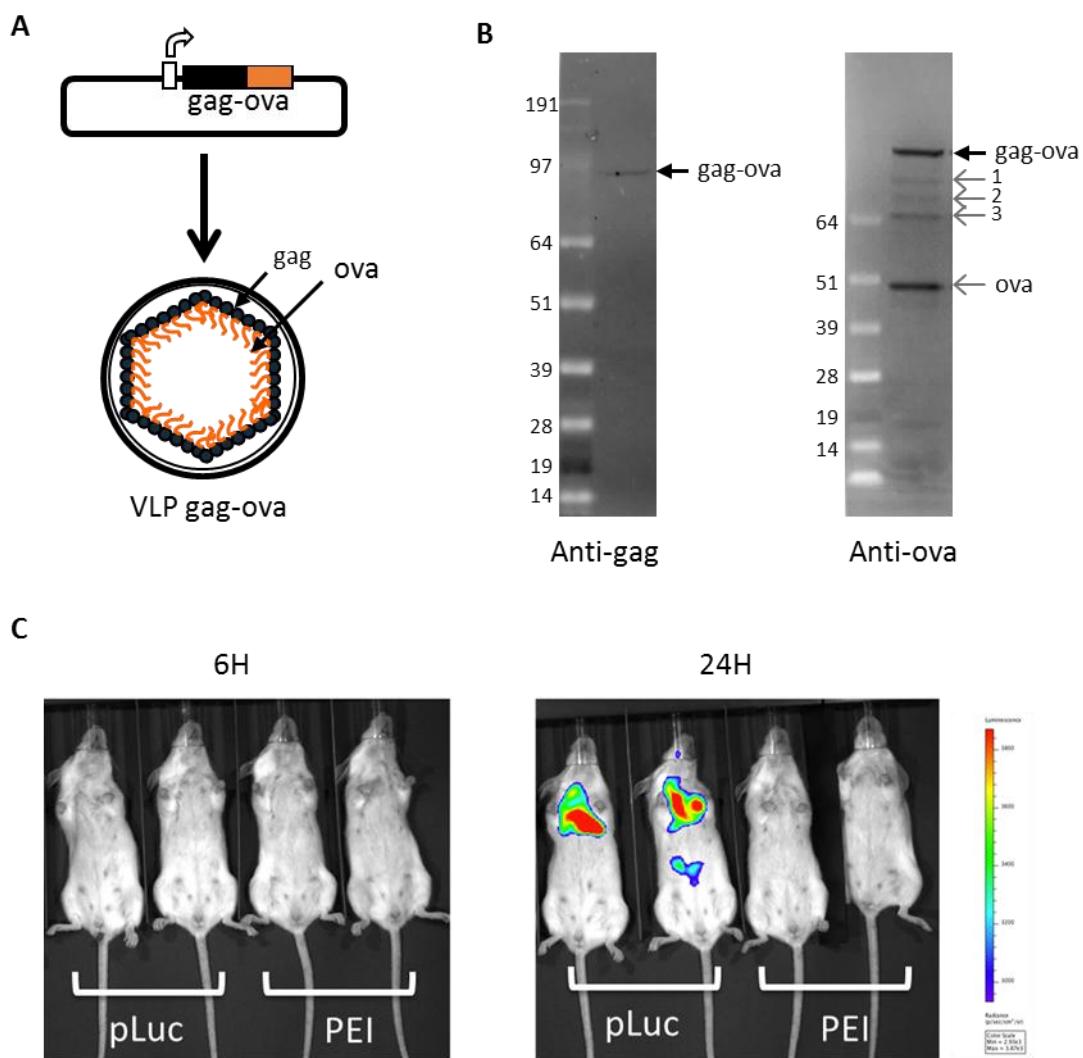


Figure 8 : Validation de la construction pVLP Gag-OVA.

(A) Schéma du plasmide pVLP-Gag-OVA et de la VLP formée après expression. (B) Le surnageant de culture des cellules transfectées avec le plasmide codant GAG-OVA est purifié par gradient de sucre puis analysé par immunodétection en Western Blot à l'aide des anticorps anti-GAG (gauche), et anti-OVA (droite). (C) Image de bioluminescences acquises à 6h (à gauche) et 24h (à droite) après une administration orale de 150 µg de pLUC (souris 1 et 2) ou de 200 µL de PEI seul (souris 3 et 4) en contrôle. L'acquisition de l'image a été réalisée 10 minutes après l'administration de luciférine sur l'appareil IVIS.

3. Validation *in vitro* et *in vivo* des constructions génétiques pIL2 et pIL10

Pour valider les plasmides codant l'IL-2 et l'IL-10 solubles, ces plasmides ont été transfectés *in vitro* dans des cellules HEK 293T. Deux jours plus tard, les cellules sont récupérées et un marquage intra-cytoplasmique est réalisé. Le phénotypage des cellules par cytométrie de flux nous indique que les plasmides pIL2 et pIL10 sont fonctionnels, démontré par l'expression intra-cellulaire d'IL-2 et d'IL-10 (Fig. 9A).

Nous avons cherché à valider *in vivo* l'action du plasmide pIL2 sur les lymphocytes T régulateurs (Fig. 9B et 9C). Des souris sont gavées avec 50 µg de pIL2 pendant 5 jours. Douze heures après la dernière administration, la rate, les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer de l'intestin sont prélevés et les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Pour ces trois organes, le pourcentage de lymphocytes T régulateurs (CD25+ FoxP3+) ou de lymphocytes Treg activés (ICOS+) reste inchangé entre les souris contrôles et les souris traitées avec le plasmide pIL2. Cependant, on observe une tendance mais non statistiquement significative à l'augmentation du nombre des lymphocytes Treg dans la rate pour le groupe pIL2.

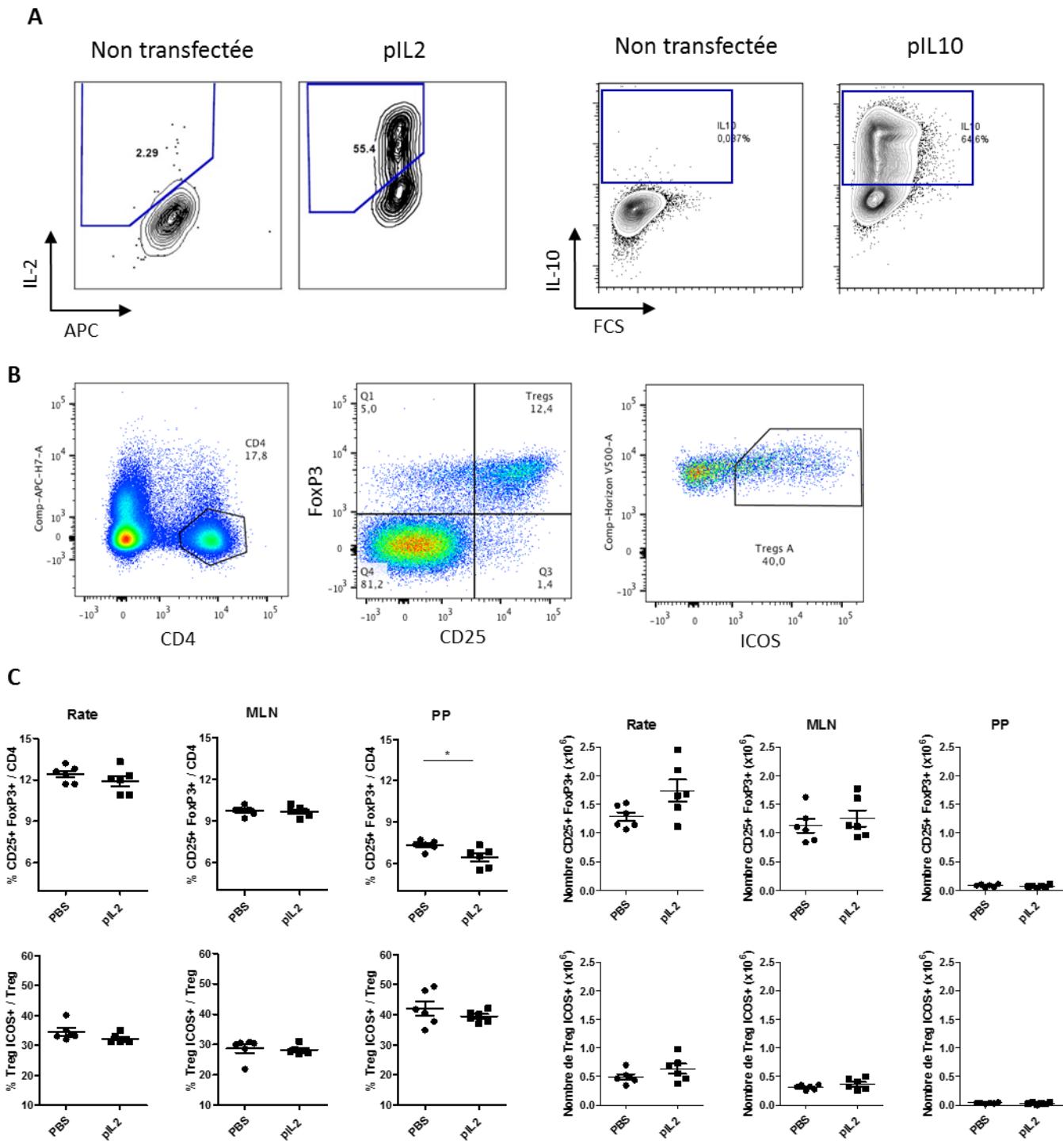


Figure 9 : Validation *in vitro* et *in vivo* des constructions génétiques pIL2 et pIL10.

(A) Validation *in vitro* des constructions pIL2 et pIL10. Les cellules transfectées ou non (PBS) avec pIL2 ou pIL10 sont récupérées deux jours après transfection et sont marquées par un anticorps anti-IL-2 ou anti-IL-10 puis analysées par cytométrie de flux. **(B)** Définition des populations de lymphocytes T CD4 (CD4+), Treg (FoxP3+ CD25+) et Treg activés (ICOS+) avec le logiciel FlowJo. **(C)** Validation *in vivo* de la construction pIL2. Des souris (n=6/groupe) ont été traitées durant 5 jours par gavage soit avec le plasmide pIL2 (50 µg), soit avec du PBS. 12h après la dernière administration, la rate, les MLN, les PP sont prélevés et l'étude phénotypique des cellules est réalisée par cytométrie en flux et analysée avec le logiciel FlowJo. Les lymphocytes T régulateurs sont identifiés parmi les CD4+ à l'aide des anticorps CD25 et FoxP3 et les Treg activés par l'expression du marqueur ICOS. **(C)** La proportion de Treg (CD25+ Foxp3+) est représentée en nombre et en pourcentage par rapport aux cellules CD4+. Les cellules ICOS+ sont représentées en pourcentage par rapport aux Treg.

4. Effet préventif de la combinaison pVLP et pIL2 ou pIL10

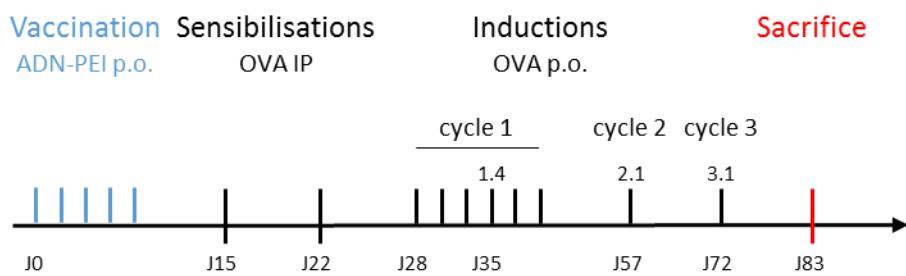
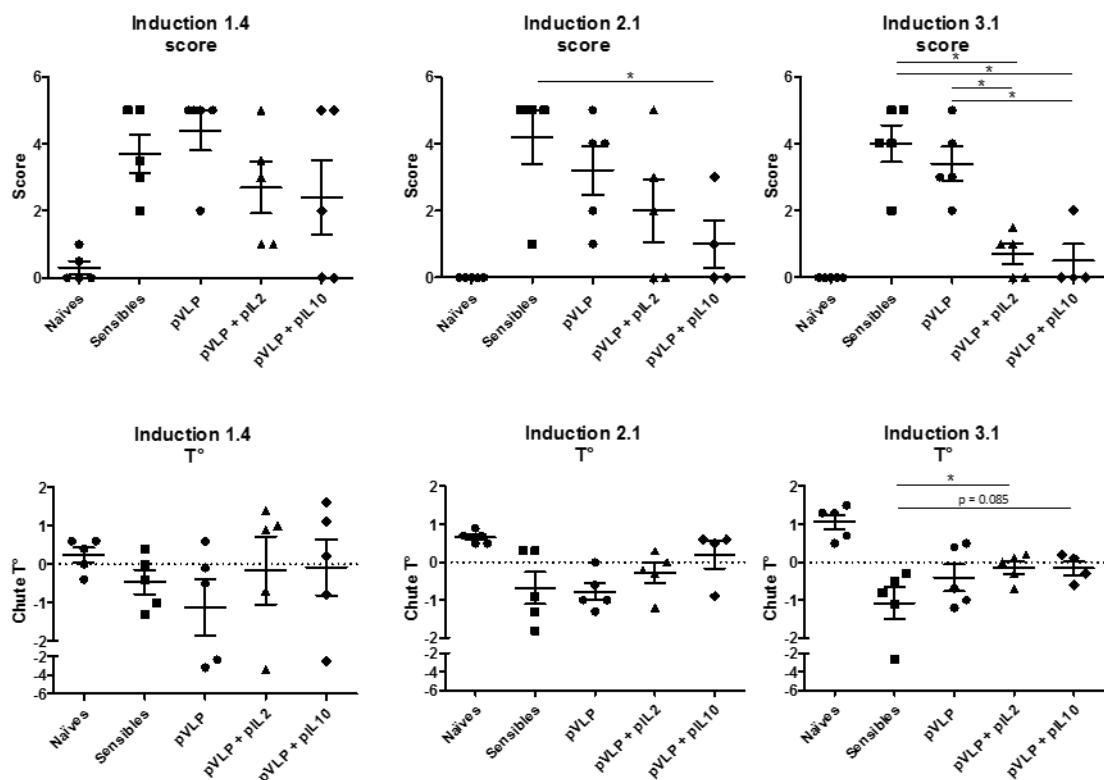
Les plasmides ayant été vérifiés, nous avons voulu tester l'intérêt de combiner les plasmides codant les cytokines immunorégulatrices IL-2 et IL-10 en association avec les pVLP.

Les souris sont traitées pendant 5 jours par l'administration orale de 50 µg de pVLP Gag-OVA en association ou non avec 50 µg de pIL2 ou 50 µg de pIL10. Les ADN sont formulés en PEI et un groupe de souris contrôle est traité avec du PBS/PEI (sensibles). Une semaine après le traitement, les souris à l'exception du groupe « naïves » sont sensibilisées à l'ovalbumine. Par la suite, l'allergie est induite pour tous les groupes de souris comme décrit précédemment (Fig. 10A). Les inductions sont réalisées par gavages successifs jusqu'à ce que 80% des souris du groupe « sensibles » (traitement au PBS/PEI) aient atteint un score clinique supérieur ou égal à 4. Trois cycles d'inductions sont réalisés, espacés de 15 jours pour évaluer la robustesse du traitement. Lors du premier cycle d'induction (Fig. 10B), les souris du groupe pVLP ne présentent pas de protection des signes cliniques par rapport aux souris du groupe « sensibles », tandis que les groupes pVLP+pIL2 et pVLP+pIL10 présentent une certaine protection mais non statistiquement significative par rapport aux souris pVLP, confirmée par la température. En revanche au cours du deuxième cycle, les groupes pVLP+pIL2 et pVLP+pIL10 montrent une protection par rapport au groupe pVLP et sensibles qui devient significative au troisième cycle. De plus, ces deux groupes bénéficient également d'une protection contre les chutes de température observées dans le groupe « sensibles » et témoignant de chocs anaphylactiques. L'efficacité des pVLP combinées aux pIL2 ou pIL10 administrés en préventif sont donc des traitements efficaces dans le temps. Cependant, les effets thérapeutiques apparaissent progressivement au cours du temps et la protection contre les signes cliniques n'est complète qu'à partir de la neuvième semaine, après la fin du traitement.

Après le dernier cycle d'induction, une analyse phénotypique des cellules de la rate, des ganglions mésentériques (MLN) et des plaques de Peyer (PP) est réalisée par cytométrie en flux (Fig. 10C). La proportion de lymphocytes T régulateurs parmi les lymphocytes T CD4+ reste inchangée entre les différents groupes de souris dans les MLN et les PP. Dans la rate, on observe une diminution significative du pourcentage de LTreg pour les souris sensibles comparé aux souris naïves. De plus, l'utilisation des plasmides pVLP ou pVLP+pIL2 ne semble

pas avoir d'effet sur le pourcentage des Treg comparé au groupe Sensible. Néanmoins, l'ajout du plasmide pIL10 associé à pVLP augmente significativement la proportion de lymphocytes Treg comparée aux pVLP seuls. Lorsque l'on s'intéresse aux Treg activés (ICOS+), l'association de pVLP avec pIL2 semble augmenter le pourcentage de Treg ICOS+ dans les ganglions. L'association de pVLP avec pIL10, quant à elle, diminue le pourcentage de LTreg ICOS+ dans la rate comparé au groupe pVLP. Le plasmide pVLP n'influe donc pas sur la proportion de lymphocytes T régulateurs ni leur activation mais l'ajout des plasmides pIL2 ou pIL10 semble légèrement modifier ces pourcentages.

D'autre part, on observe dans ces trois organes que la sensibilisation à l'allergène augmente le pourcentage de cellules B mémoire (IgD- IgM-) parmi les lymphocytes B (CD19+) ainsi que la proportion de cellules produisant des IgE. Le traitement par les VLP semble diminuer le pourcentage de cellules mémoires comparé aux souris sensibles dans les trois organes mais n'influe pas sur la production d'IgE+ par ces cellules. En revanche, l'ajout du pIL2 associé au pVLP augmente significativement le pourcentage de lymphocytes B mémoires et diminue la production d'IgE uniquement dans les plaques de Peyer, comparé au pVLP seul. D'autre part, le groupe pVLP+pIL10 semble diminuer le pourcentage de cellules B mémoire dans les ganglions ainsi que leur production d'IgE mais cette diminution n'est effective que pour la moitié des souris de ce groupe. La diminution du pourcentage de cellules IgE+ s'observe également dans les plaques de Peyer et la rate.

A**B**

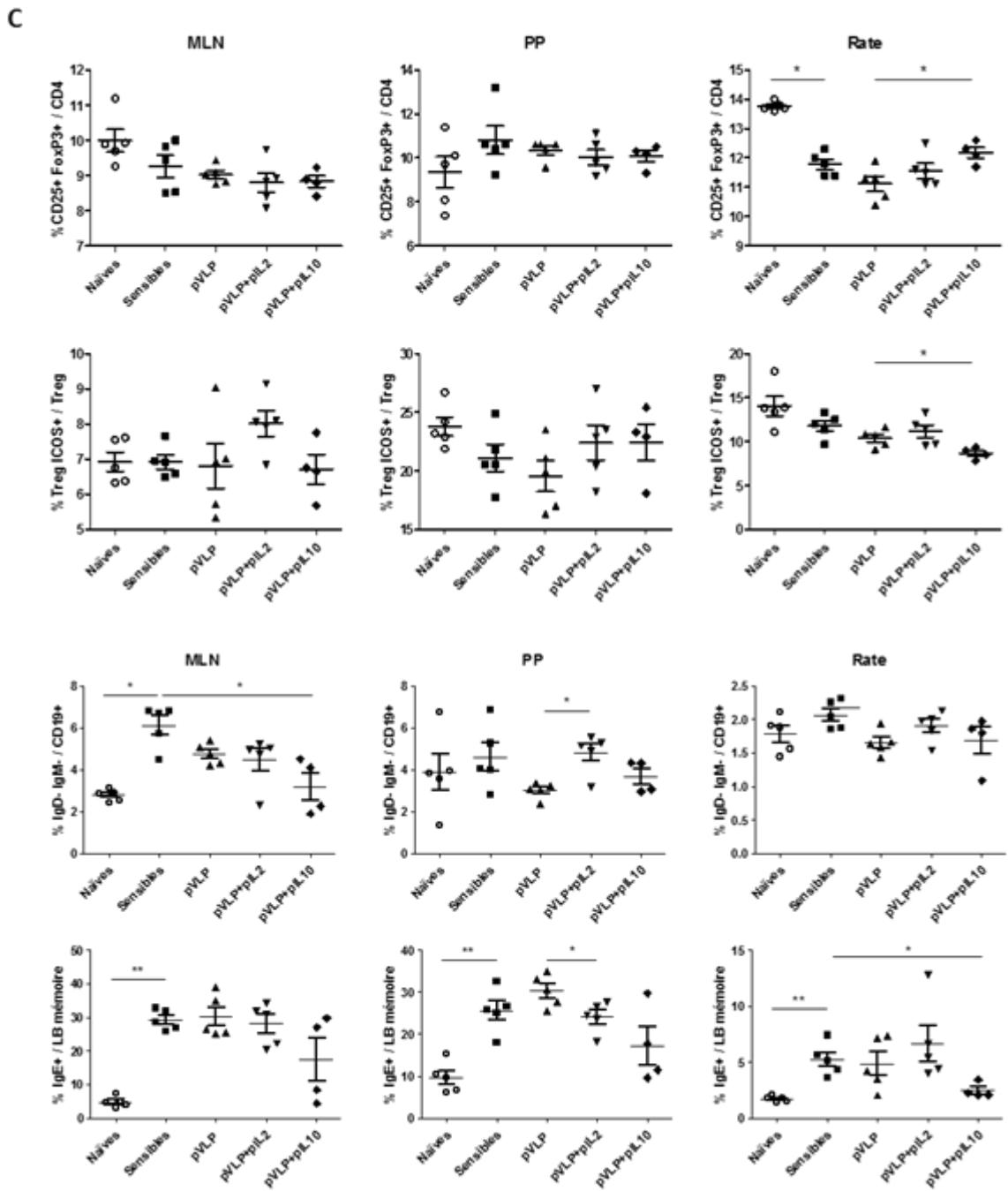
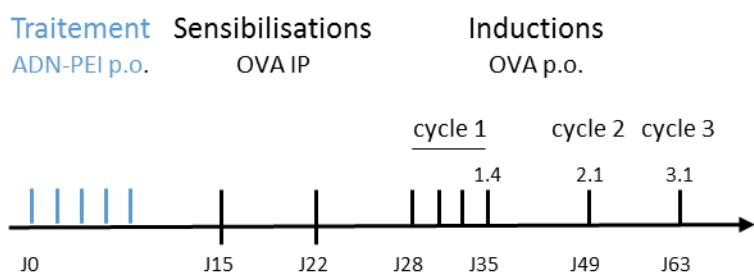
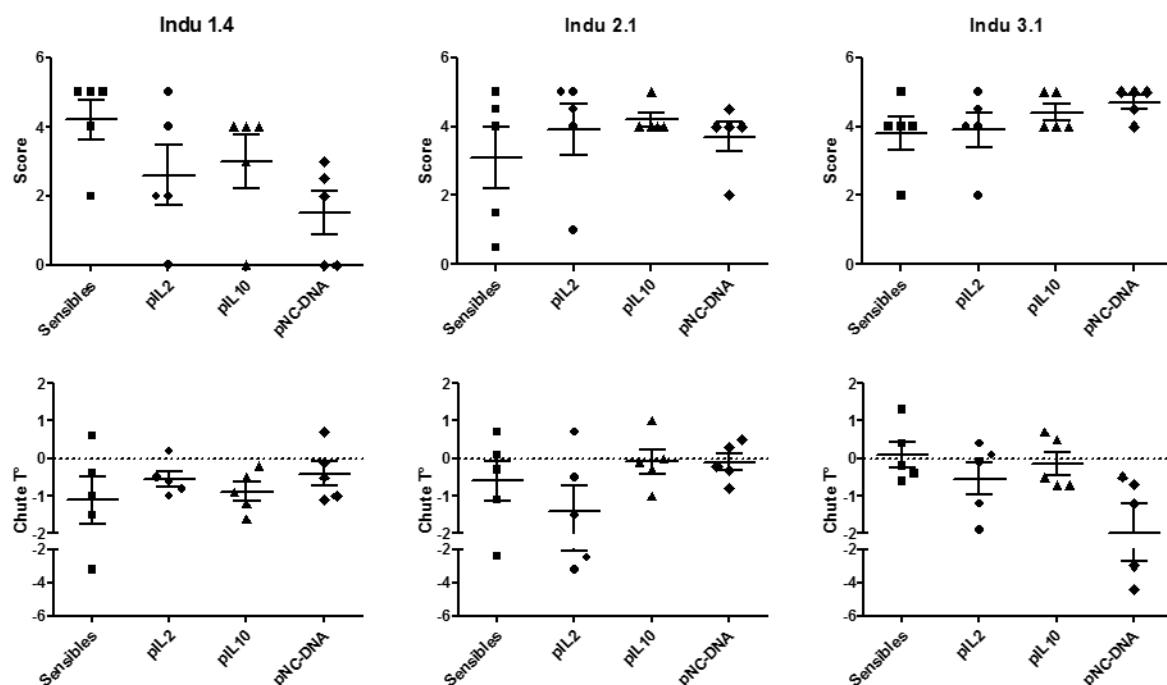


Figure 10 : Effet préventif de la combinaison pVLP et pIL2 ou pIL10.

(A) Protocole expérimental. Les souris ($n=5/\text{groupe}$) sont traitées quotidiennement pendant 5 jours par l'administration orale de 200 μL de PBS ou de pVLP (50 μg) en association ou non avec pIL2 (50 μg) ou pIL10 (50 μg) formulés en PEI. Une semaine après le traitement, les souris sont sensibilisées à l'ovalbumine par deux injections *i.p.* d'OVA+Alum à une semaine d'intervalle. Des gavages de 20 mg d'OVA sont réalisés tous les 2 jours jusqu'à l'obtention de 80% de souris malades pour le groupe contrôle (sensibles). Trois cycles de gavages ont été réalisés à 15 jours d'intervalle correspondant à 6 inductions pour le cycle 1 et une induction pour les cycles 2 et 3. (B) Les scores cliniques de chaque souris et leur température sont évalués à chaque induction. Les scores représentés correspondent à l'induction 4 du cycle 1 (1.4) et aux premières inductions des cycles 2 et 3 (2.1 et 3.1). (C) Immunophénotypage. Au terme du cycle 3, les souris sont sacrifiées et la rate, les MLN, et les PP sont prélevés. L'étude phénotypique est réalisée par cytométrie en flux. Les lymphocytes Treg (CD25+ Foxp3+) sont représentés en pourcentage des lymphocytes CD4+ et les cellules ICOS+ en pourcentage des Treg. Les lymphocytes B mémoires (IgM- IgD-) sont représentés en pourcentage des LB et les cellules B IgE+ en pourcentage des LB mémoire. ($n=5$) Les analyses statistiques sont réalisées par des tests non paramétriques de Mann-Whithney pour un seuil α de 0,05. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

5. Effet des plasmides pIL2 et pIL10

Afin d'évaluer l'impact thérapeutique des plasmides seuls codant pour les cytokines IL-2 et IL-10 dans la protection des signes cliniques observés précédemment et indépendamment du pVLP, nous avons réalisé une expérience similaire où les souris sont traitées en préventif avec 50 µg de pIL2 ou 50 µg de pIL10 ou 50 µg d'un plasmide non codant (pncDNA). Les souris sont ensuite sensibilisées et l'allergie est induite suivant le même protocole que les expériences précédentes (Fig. 11A). Nous avons pu observer qu'en absence de pVLP, les plasmides pIL2 et pIL10 ne permettent pas de protéger les souris des signes cliniques de l'allergie. En effet, pour tous les cycles d'induction, les scores cliniques des groupes traités sont similaires au groupe contrôle « sensible » avec des scores supérieurs ou égaux à 4 au troisième cycle et une protection contre les chutes de température qui varie en fonction des cycles (Fig. 11B). La combinaison des pVLP associés à pIL2 ou pIL10 semble donc nécessaire pour induire un état de protection suffisant pour protéger des signes cliniques de l'allergie alimentaire.

A**B****Figure 11 : Effet des plasmides pil2 et pil10.**

(A) Protocole expérimental. Les souris (n=5/groupe) sont traitées quotidiennement pendant 5 jours par l'administration orale de 200 µL de PBS ou de pil2 (50 µg) ou de pil10 (50 µg) ou de l'ADN plasmidique mock contrôle pncDNA (50 µg) formulés en PEI. Une semaine après le traitement, les souris sont sensibilisées à l'ovalbumine par deux injections *i.p.* d'OVA+Alum à une semaine d'intervalle. Des gavages de 20 mg d'OVA sont réalisés tous les 2 jours. Trois cycles de gavages ont été réalisés à 15 jours d'intervalle correspondant à 4 inductions pour le cycle 1 et une induction pour les cycles 2 et 3. **(B)** Les scores cliniques de chaque souris et la chute de température sont évalués à chaque induction. Les scores représentés correspondent à l'induction 4 du cycle 1 (1.4) et aux premières inductions des cycles 2 et 3 (2.1 et 3.1).

6. Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL2

Dans le but d'améliorer les effets thérapeutiques de la combinaison des pVLP 50 µg avec 50 µg de pIL2, nous avons réalisé une expérience semblable en augmentant la dose de pVLP Gag-OVA à 100 µg par souris et par jour durant le traitement. En plus, afin d'évaluer le rôle des lymphocytes T régulateurs dans la mise en place de la réaction allergique, un groupe de souris a reçu deux injections de PC61 (anti-CD25) afin d'éliminer les Treg. Une première injection de 100 µg de PC61 a été réalisée trois jours après la fin du traitement, suivie d'une deuxième injection deux jours plus tard. La semaine suivante, les souris sont sensibilisées et l'allergie est induite selon le même protocole que les expériences précédentes (Fig. 12A). Pendant le premier cycle d'induction, les groupes pIL2, pVLP et pVLP+pIL2 semblent bénéficier d'une protection partielle comparés aux souris « sensibles » (Fig. 12B). Mais au cours du deuxième cycle d'induction, seul le groupe pVLP+pIL2 conserve une protection significative contre les signes cliniques et les chutes de température alors que tous les autres groupes de souris sont malades. Enfin, pendant le troisième cycle d'induction, aucune souris n'est protégée contre l'allergie. Par ailleurs, on remarque que dès le premier cycle d'induction, les souris ayant reçu des injections de PC61 développent très rapidement les symptômes de l'allergie et subissent des chocs anaphylactiques indiqués par de fortes chutes de température. Les plasmides pIL2 et pVLP semblent donc offrir aux souris une protection partielle pendant les cinq premières semaines après la fin du traitement alors que seule la combinaison des plasmides pVLP+pIL2 permet de conserver cette protection jusqu'à huit semaines. Cependant, aucun des traitements testé pour ce protocole n'est efficace au-delà de 10 semaines. Contrairement à la dose de 50 µg testée précédemment (Fig.4), l'utilisation des pVLP à 100 µg ne permet donc pas une meilleure efficacité du traitement.

En parallèle, l'état d'activation des cellules effectrices de l'allergie a été évalué avant le troisième cycle d'induction par un test de dégranulation des mastocytes et des basophiles (Fig. 12C). Pour ce faire, du sang est prélevé sur chaque souris et les cellules sont mises en condition de restimulation par une incubation d'une heure à 37°C en présence d'ovalbumine. Les cellules granulocytaires sont ensuite analysées par cytométrie de flux : leur état de dégranulation, c'est-à-dire la libération des molécules contenues dans les granules de ces cellules, est évalué par le marqueur CD200R. L'activation des mastocytes et basophiles est également étudiée par la présence du marqueur CD63. Ces deux marqueurs

sont plus exprimés dans le groupe sensible comparé aux souris naïves témoignant d'une activation de ces cellules lors des allergies. Mais, tous les groupes de souris traitées expriment le CD63 et le CD200R à un niveau similaire aux souris « sensibles » ce qui indique que le traitement administré 8 semaines plus tôt n'agit pas ou n'a plus d'effet sur l'activation des mastocytes et des basophiles. Ce résultat est en accord avec les scores cliniques observés lors du troisième cycle d'induction puisqu'aucune souris n'est plus protégée de l'allergie.

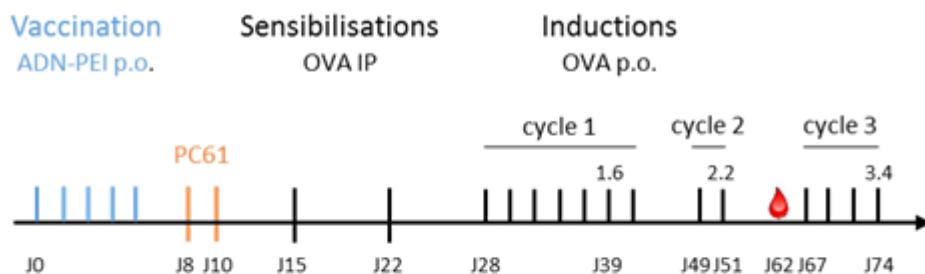
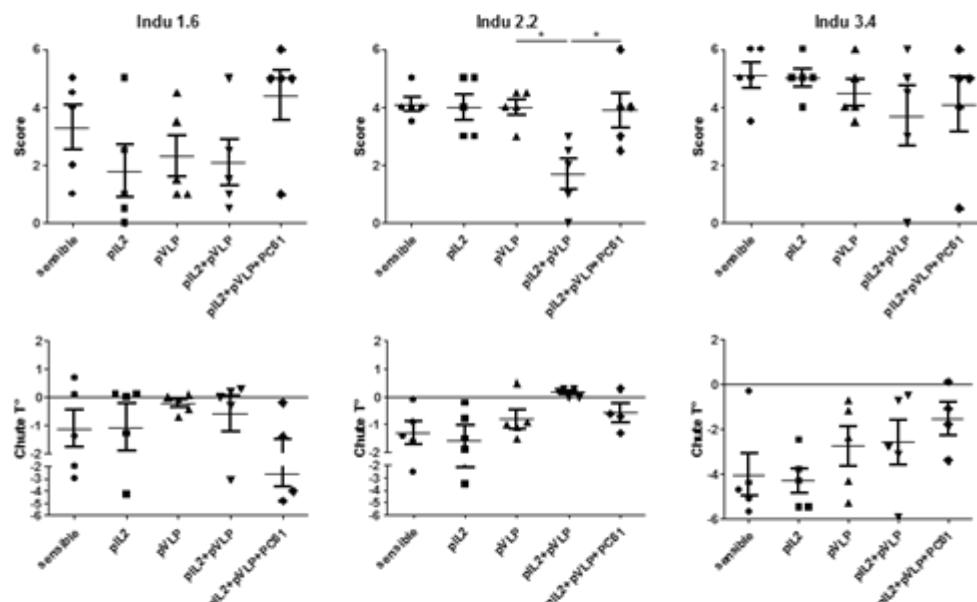
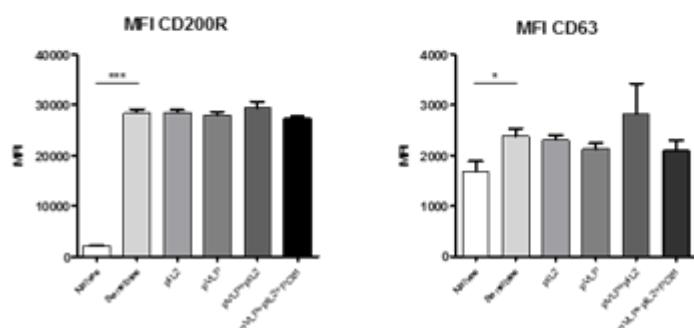
A**B****C**

Figure 12 : Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL2.

(A) Protocole expérimental. Les souris ($n=5/\text{groupe}$) sont traitées quotidiennement pendant 5 jours par l'administration orale de 200 µL de PBS ou de pVLP (100 µg) ou de pIL2 (50 µg) ou pVLP (100 µg) + pIL2 (50 µg) formulés en PEI. Trois jours après le traitement, un des groupes de souris traitées avec pVLP+pIL2 reçoit 2 injections *i.p.* de 100 µg de PC61 à deux jours d'intervalle. Toutes les souris sont ensuite sensibilisées à l'ovalbumine par deux injections *i.p.* d'OVA+Alum à une semaine d'intervalle. Des gavages de 20 mg d'OVA sont réalisés tous les 2 jours. Trois cycles de gavages ont été réalisés à 15 jours d'intervalle correspondant à 7 inductions pour le cycle 1 et 2 inductions pour les cycles 2 et 4 inductions pour le cycle 3.**(B)** Les scores cliniques de chaque souris et la chute de température sont évalués à chaque induction. Les scores représentés correspondent à l'induction 4 du cycle 1 (1.4) et aux premières inductions des cycles 2 et 3 (2.1 et 3.1). **(C)** Test d'activation des basophiles et mastocytes. 300 µL de sang sont prélevés sur les souris à J62 et les cellules sont incubées en conditions de restimulation pendant 1 heure à 37°C avec du RPMI seul ou 1 mg d'OVA ou un anti-IgE. Une étude phénotypique des cellules est ensuite réalisée par cytométrie en flux. Les MFI du CD200R (dégranulation) et du CD63 (activation) des cellules FcεR1+ CD45low sont représentées pour la condition OVA.

7. Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL10

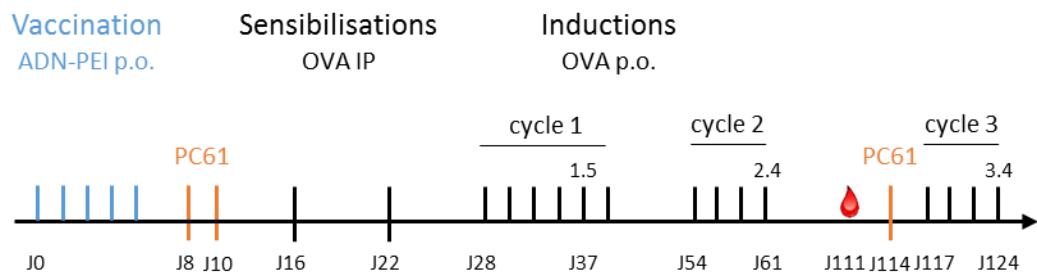
La même expérience est réalisée en parallèle avec le plasmide pIL10 : des souris sont gavées pendant 5 jours avec 50 µg de pIL10 ou 100 µg de pVLP ou 100 µg de pVLP + 50 µg de pIL10 et un groupe de souris reçoit deux injections de PC61. La semaine suivante, les souris sont sensibilisées et l'allergie est induite selon le même protocole que les expériences précédentes (Fig. 13A).

Au cours du premier cycle d'induction, les souris du groupe pIL10 sont protégées, comme en témoigne une réduction significative des symptômes de l'allergie comparativement au groupe Sensibles (Fig. 13B). Les groupes pVLP et pVLP+pIL10 quant à eux bénéficient d'une protection partielle pour les scores mais sont protégés de la perte de température corporelle. En revanche, les souris qui ont reçu les injections de PC61 sont comparables au groupe Sensibles démontrant l'implication des lymphocytes T régulateurs dans le contrôle des réactions allergiques. Au cours du deuxième cycle d'induction et malgré l'hétérogénéité intra-groupe, seul le groupe pVLP+pIL10 bénéficie d'une protection contre les symptômes cliniques et les chutes de température. A noter que deux souris du groupe pVLP sont décédées à la suite de la quatrième induction. Enfin, au cours du dernier cycle d'induction, on observe que les trois souris du groupe pVLP+pIL10 protégées dans le deuxième cycle ont conservé leur protection dans le troisième cycle au niveau du score et de la chute de température. Etonnamment, les trois souris du groupe pVLP qui ont survécu conservent une certaine protection des signes cliniques et de la perte de température. Par ailleurs, nous avons constaté dans l'expérience précédente que les souris ayant reçu des injections de PC61 devenaient moins sensibles aux chutes de température au cours des cycles 2 et 3 (Fig. 13B). C'est pourquoi, avant le troisième cycle d'induction, nous avons réalisé une nouvelle injection de PC61 pour le groupe pVLP+pIL10+PC61 (Fig. 13A). Ainsi, au cours du troisième cycle d'induction, les souris dépourvus en lymphocytes Treg présentent des scores cliniques élevés et des chutes de température sévères (Fig. 13B).

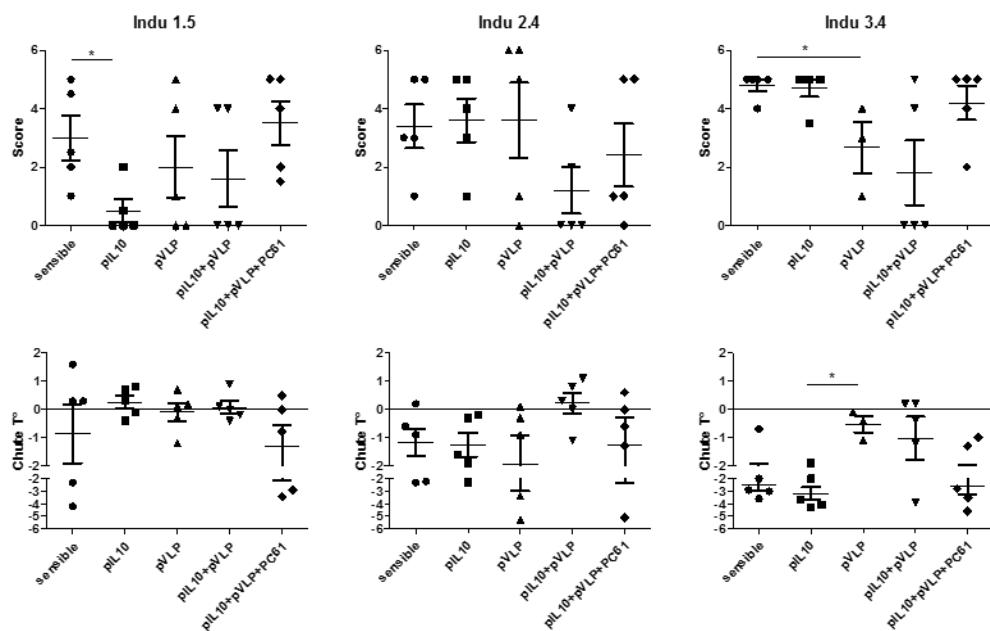
En parallèle, l'état d'activation des cellules effectrices de l'allergie est évalué avant le troisième cycle d'induction par un test de dégranulation des mastocytes et des basophiles (Fig. 13C) selon le même protocole que dans l'expérience précédente. Aucune différence de

fluorescence entre les groupes de souris traités et sensibles n'a pu être observée pour les marqueurs de dégranulation (CD200R) et d'activation (CD63) de ces cellules.

A



B



C

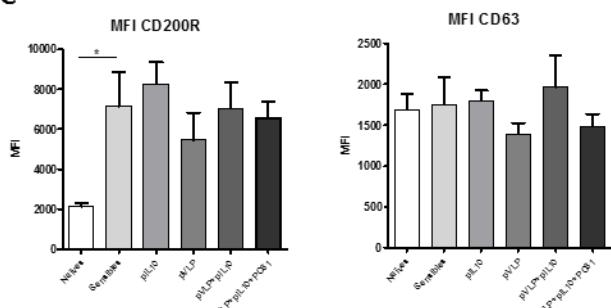


Figure 13 : Effet préventif de la combinaison de pVLP à 100 µg et pIL10.

(A) Protocole expérimental. Les souris (n=5/groupe) sont traitées quotidiennement pendant 5 jours par l'administration orale de 200 µL de PBS ou de pVLP (100 µg) ou de pIL10 (50 µg) ou pVLP (100 µg) + pIL10 (50 µg) formulés en PEI. Trois jours après le traitement, un des groupes de souris traitées avec pVLP+pIL10 reçoit 2 injections *ip* de 100 µg de PC61 à deux jours d'intervalle. Toutes les souris sont ensuite sensibilisées à

l'ovalbumine par deux injections *ip* d'OVA+Alum à une semaine d'intervalle. Des gavages de 20 mg d'OVA sont réalisés tous les 2 jours jusqu'à l'obtention de 80% de souris malades pour le groupe contrôle (sensibles). Trois cycles de gavages ont été réalisés à 15 jours d'intervalle correspondant à 6 inductions pour le cycle 1, 4 inductions pour les cycles 2 et 3.**(B)** Les scores cliniques de chaque souris et la chute de température sont évalués à chaque induction. Les scores représentés correspondent à l'induction 5 du cycle 1 (1.5), à l'induction 4 du cycle 2 (2.4) et à l'induction 4 du cycle 3 (3.4).**(C)** Test d'activation des basophiles et mastocytes. 300 µL de sang sont prélevés sur les souris à J111 et les cellules sont incubées en conditions de restimulation pendant 1 heure à 37°C avec du RPMI seul ou 1 mg d'OVA ou un anti-IgE. Une étude phénotypique des cellules est ensuite réalisée par cytométrie en flux. La MFI du CD200R (dégranulation) et du CD63 (activation) des cellules FcεR1+ CD45low est représenté pour la condition de restimulation OVA.

II. Mécanismes immunologiques de l'immunothérapie par les VLP

Pour comprendre les mécanismes d'action des VLP Gag-OVA produites *in vivo* dans les expériences d'immunothérapie utilisant la stratégie des plasmoVLP, nous avons réalisé des expériences avec des VLP fluorescentes. L'objectif est d'identifier les différentes populations de cellules immunitaires qui prennent en charge les VLP Gag-OVA au niveau de l'intestin grêle. Nous avons donc produit des VLP couplées à la GFP (VLP Gag-GFP) afin de détecter grâce à la GFP (green fluorescent protein) les cellules qui capturent les VLP. Nous avons dans un premier temps utilisé une méthode de cytométrie en flux, permettant d'analyser les populations de cellules obtenues après digestion des tissus ; puis une méthode d'immunofluorescence afin d'observer *in situ* la localisation des rétroVLP Gag-GFP dans l'intestin grêle.

1. Validation de la formation et de la fluorescence des VLP Gag-GFP

Les rétroVLP fluorescentes sont produites après transfection de cellules HEK 293T avec un plasmide codant pour la protéine de fusion Gag-GFP. La protéine de fusion, produite par la cellule, va s'auto-assembler pour former les rétroVLP Gag-GFP. Pour vérifier la bonne formation de ces rétroVLP Gag-GFP (Fig. 14A), un Western Blot est réalisé à partir des surnageants purifiés par gradient de sucrose. La protéine de fusion Gag-GFP est détectée par Western Blot en utilisant des anticorps anti-Gag et anti-GFP (Fig. 14B) et comparée en contrôle aux rétroVLP Gag-OVA (112 KDa). La présence des bandes attendues à la taille de la protéine de fusion Gag-GFP (92 KDa), et ce sur les deux membranes révélées avec l'anti-Gag et l'anti-GFP, nous indique que les rétroVLP contiennent bien la protéine chimérique Gag-GFP.

La fluorescence des rétroVLP, quant à elle, peut être observée sous UV en purifiant les rétroVLP sur un gradient de sucrose (Fig. 14C). Nous avons également pu observer au microscope à fluorescence que des cellules dendritiques humaines mises en culture *in vitro* en présence des rétroVLP fluorescentes captent ces VLP (Fig. 14D).

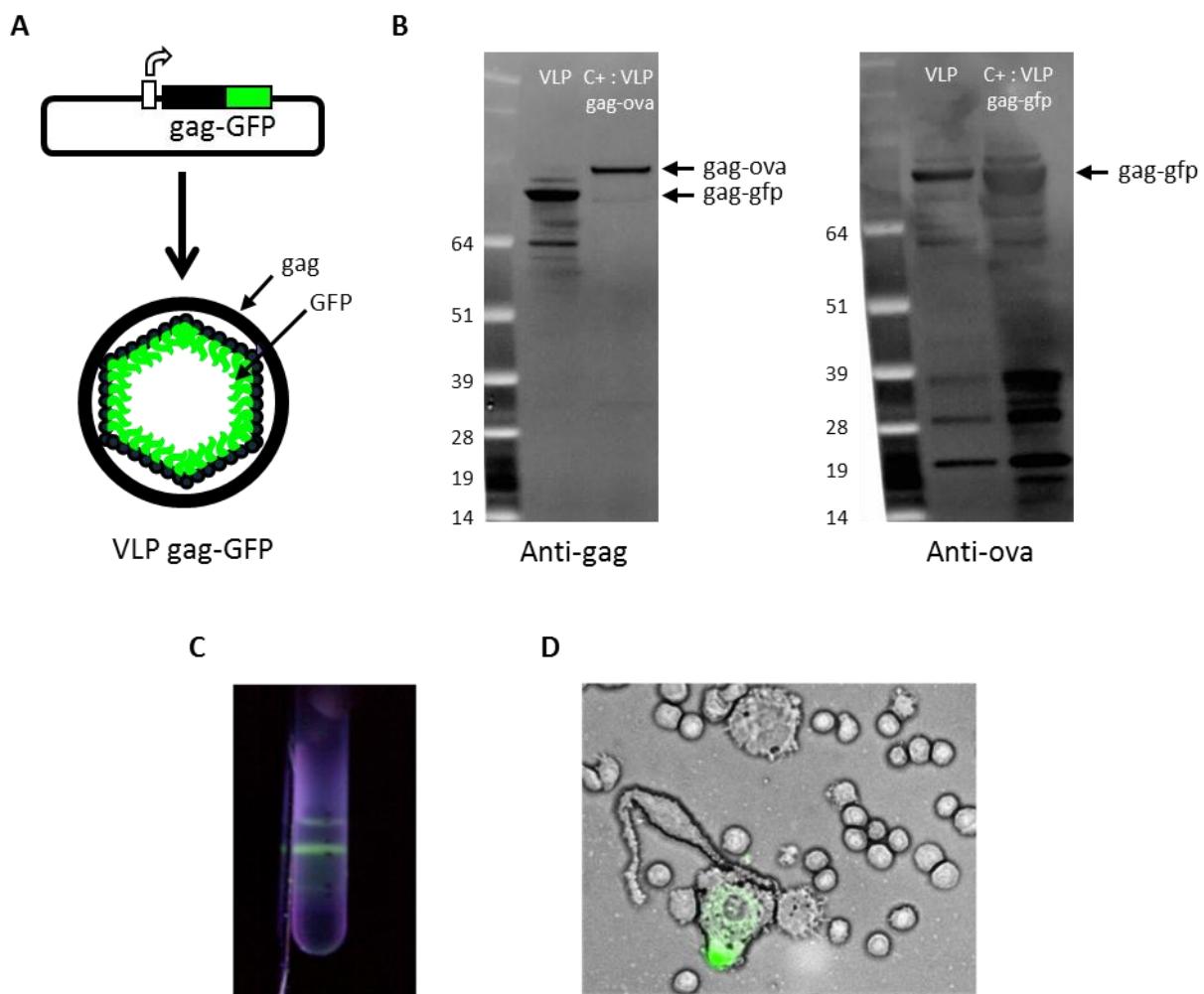


Figure 14 : Validation de la formation et de la fluorescence des rétroVLP Gag-GFP.

(A) Schéma d'un pVLP Gag-GFP et de la VLP formée après expression. (B) Western Blot anti-Gag (à gauche) et anti-GFP (à droite) afin de valider la présence de la protéine de fusion Gag-GFP (92 KDa) dans les VLP produites. Des VLP Gag-Ova sont utilisées comme contrôle afin de vérifier que l'anticorps reconnaît bien la protéine de fusion Gag-Ova (112 KDa). (C) Observation de la fluorescence des VLP sous UV après leur concentration sur gradient de sucre. (D) Culture de cellules dendritiques en présence de VLP fluorescentes. La capture des VLP par les cellules dendritiques est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence (grossissement x400).

2. Capture des VLP Gag-GFP par les cellules de l'intestin

Une première expérience a été réalisée *ex vivo* sur des intestins de souris pour simplifier la technique. Des intestins de souris sont prélevés, injectés avec une solution contenant les VLP-GFP ou avec du PBS en contrôle, ligaturés aux extrémités puis mis en culture pendant 1 heure. Les tissus sont ensuite traités par digestion enzymatique puis les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Cependant, la majorité des cellules de l'intestin n'ont pas survécu, témoignant de problèmes de viabilité en utilisant cette technique.

Pour limiter les problèmes de viabilité cellulaire observés dans le modèle *ex vivo*, nous avons donc travaillé par la suite avec un modèle *in vivo*. Des souris sont gavées avec du PBS ou des VLP-GFP ou de l'ovalbumine couplée à un fluorochrome (OVA-A488) et les intestins sont traités en séparant chaque tissu : les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), les cellules de la lamina-propria (LPL) et les plaques de Peyer (PP).

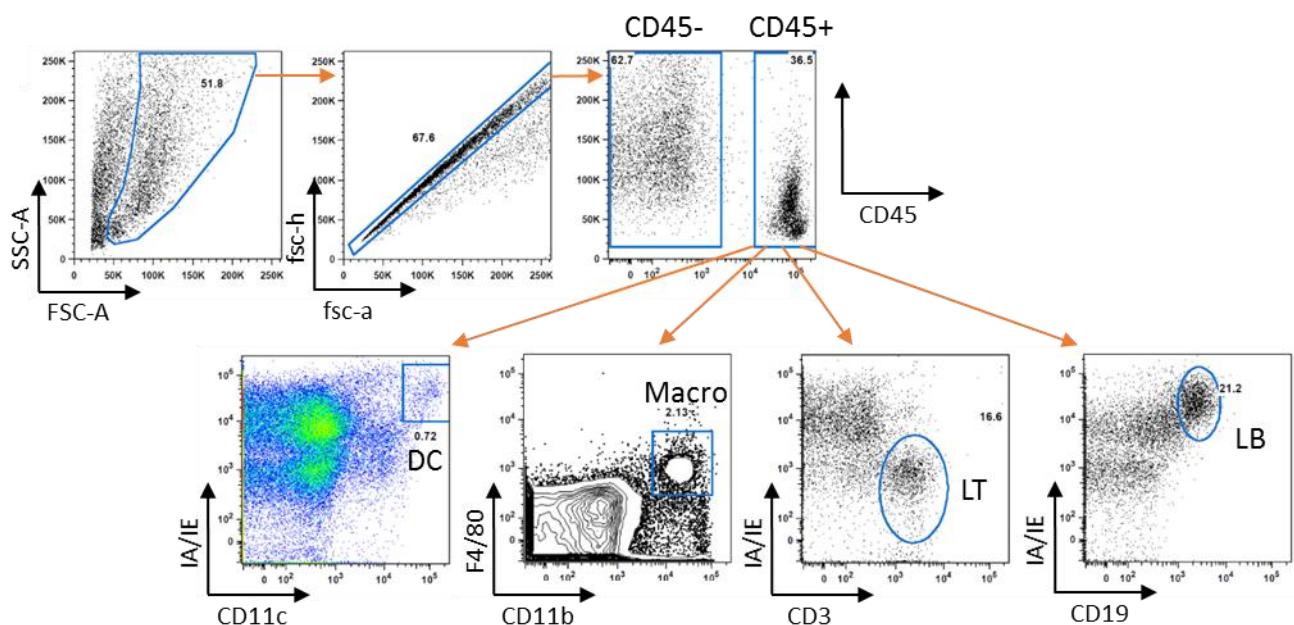
a. Stratégie de définition des populations de cellules immunitaires

Pour chaque tissu, une analyse phénotypique des populations de cellules est réalisée par cytométrie en flux (Fig. 15A). Les cellules dendritiques (DC) sont identifiées par les anticorps IA/IE (CMH-II) et CD11c. Les macrophages (Macro) sont reconnus par les anticorps F4/80 et CD11b. Les lymphocytes T (LT) sont identifiés par l'anticorps CD3 ; les anticorps CD4 et CD8 nous permettent d'identifier les sous-populations de lymphocytes T auxiliaires (LT CD4) et cytotoxiques (LT CD8). Enfin, les lymphocytes B sont identifiés à partir des cellules immunitaires CD45+, exprimant le marqueur B220.

Une première analyse est réalisée afin de connaître le pourcentage de cellules immunitaires (CD45+) obtenu dans chaque tissu avec le protocole utilisé (Fig. 15B). Dans les IEL, on remarque la présence d'une forte proportion de cellules non immunitaires (CD45-) dont on peut supposer qu'il s'agit de cellules épithéliales. La présence de ces cellules dans les LPL montre que les échantillons de LPL sont également contaminés partiellement par des cellules épithéliales. En revanche, les plaques de Peyer sont composées à 99 % de cellules CD45+. La répartition des cellules présentes dans chaque tissu est également déterminée. Comme attendu, les IEL sont principalement composés de lymphocytes T CD8+ ; les LPL sont

composés de lymphocytes T et de cellules présentatrices d'antigènes ; enfin, une forte proportion de lymphocytes B compose les plaques de Peyer.

A



B

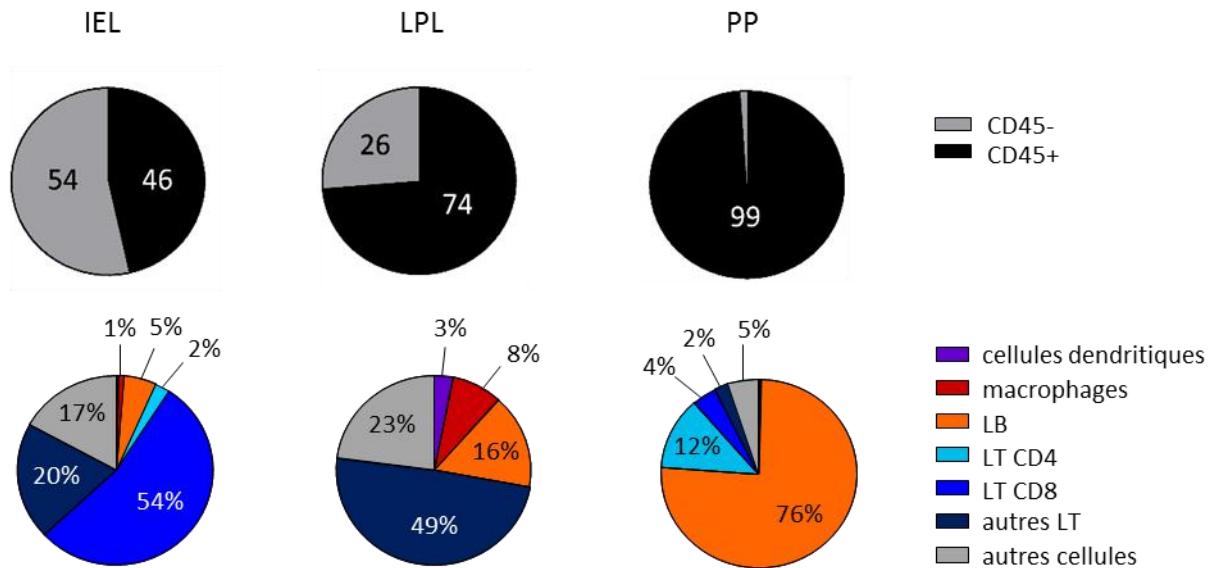


Figure 15 : Stratégie de définition des différentes populations de cellules immunitaires analysées avec le logiciel FlowJo.

(A) Les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T (CD4 et CD8) et les lymphocytes B sont identifiés à l'aide des anticorps CD45, IA/IE, CD11c, F4/80, CD11b, CD3, CD4, CD8 et B220. (B) Détermination des pourcentages et répartition des populations de cellules immunitaires (CD45+) et non immunitaires (CD45-) étudiées dans chaque tissu.

b. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules de l'intestin

Plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de déterminer les cellules qui capturent les VLP-GFP. Dans un premier temps, les souris ont été gavées avec 200 µL de PBS ou de VLP-GFP ou d'une protéine ovalbumine couplée à un fluorochrome (OVA-488) utilisé en contrôle. Des souris sont gavées avec 200 µg de VLP-GFP ou 100 µg d'OVA-488 et les intestins sont prélevés soit 1 heure soit 5 heures après l'administration. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux en utilisant la stratégie de sélection des populations cellulaires définie précédemment. Cependant, aucune cellule GFP n'a pu être identifiée pour les souris gavées avec les VLP-GFP alors que l'OVA-488 est majoritairement captée par les macrophages et les cellules dendritiques.

Afin d'éviter la possible dégradation des VLP par les enzymes gastriques, la suite des expériences a été réalisée en injectant les VLP-GFP dans le duodénum des intestins. Les souris sont anesthésiées afin d'injecter les VLP-GFP directement dans le duodénum de l'intestin avec une seringue. Une première expérience est faite avec 100µL de PBS ou 50 µg de VLP-GFP ou 50 µg d'OVA-488 et les intestins sont prélevés et traités 2H après l'injection. Cependant, nous n'avons pu identifier aucune cellule GFP dans les souris qui ont reçu des VLP.

Compte tenu des résultats obtenus dans les expériences précédentes, nous avons fait le choix d'ajouter une enveloppe VSV-G sur les VLP-GFP afin d'augmenter leur capacité à infecter les cellules (Temchura et al., 2008). L'enveloppe VSV-G correspond à la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Cette glycoprotéine favorise la fixation de la VLP à la cellule cible et permet la fusion des membranes cellulaires et virales. Nous avons alors produit des rétroVLP Gag-GFP enveloppés avec VSV-G (VLP-GFP/VSVg).

Deux expériences ont été réalisées en injectant 100 µg de VLP-GFP/VSVg dans les intestins. Les intestins, les plaques de Peyer et les ganglions drainants (ganglions mésentériques) sont prélevés 2 heures ou 12 heures après l'injection des VLP. Malgré tous ces essais, aucune cellule GFP n'est observée par cytométrie en flux pour les souris ayant reçu les VLP.

Administrations	Gavage	Gavage	Injection	Injection	Injection
Doses	200 µg VLP-GFP 100 µg OVA488 PBS	200 µg VLP-GFP 100 µg OVA488 PBS	50 µg VLP-GFP 50 µg OVA488 PBS	100 µg VLP-GFP/VSVg 50 µg OVA488 PBS	100 µg VLP-GFP/VSVg 50 µg OVA488 PBS
Prélèvements	1H	5H	2H	2H	12H
% GFP	<u>INTESTIN :</u> VLP - / OVA ± 0,8 % <u>PP :</u> VLP - / OVA ± 1 % <u>MLN :</u> VLP - / OVA -	<u>INTESTIN :</u> VLP - / OVA ± 0,8 % <u>PP :</u> VLP - / OVA ± 1 % <u>MLN :</u> VLP - / OVA -	<u>INTESTIN :</u> VLP - / OVA ± 0,3 % <u>PP :</u> ND <u>MLN :</u> VLP - / OVA -	<u>INTESTIN :</u> VLP - / OVA ± 0,05 % <u>PP :</u> VLP ± 0,02 % / OVA ± 0,1 % <u>MLN :</u> ND	<u>INTESTIN :</u> VLP - / OVA ± 5 % <u>PP :</u> VLP - / OVA ± 0,1 % <u>MLN :</u> VLP - / OVA ± 0,5 %

Tableau 1 : Résumé des expériences de capture des VLP-GFP dans les intestins

Pour l'ensemble de ces expériences, tous les résultats obtenus sont similaires : aucune cellule GFP n'est détectée pour les souris traitées avec du PBS ou les VLP-GFP avec ou sans VSVg. Cependant, pour les souris traitées avec de l'OVA-488, des cellules GFP sont observées parmi les cellules immunitaires totales (CD45+), les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules non immunitaires (CD45-) (Fig. 16). Ces résultats s'observent dans les IEL, LPL ou intestins complets mais aucune cellule fluorescente n'est présente dans les plaques de Peyer ou les ganglions mésentériques.

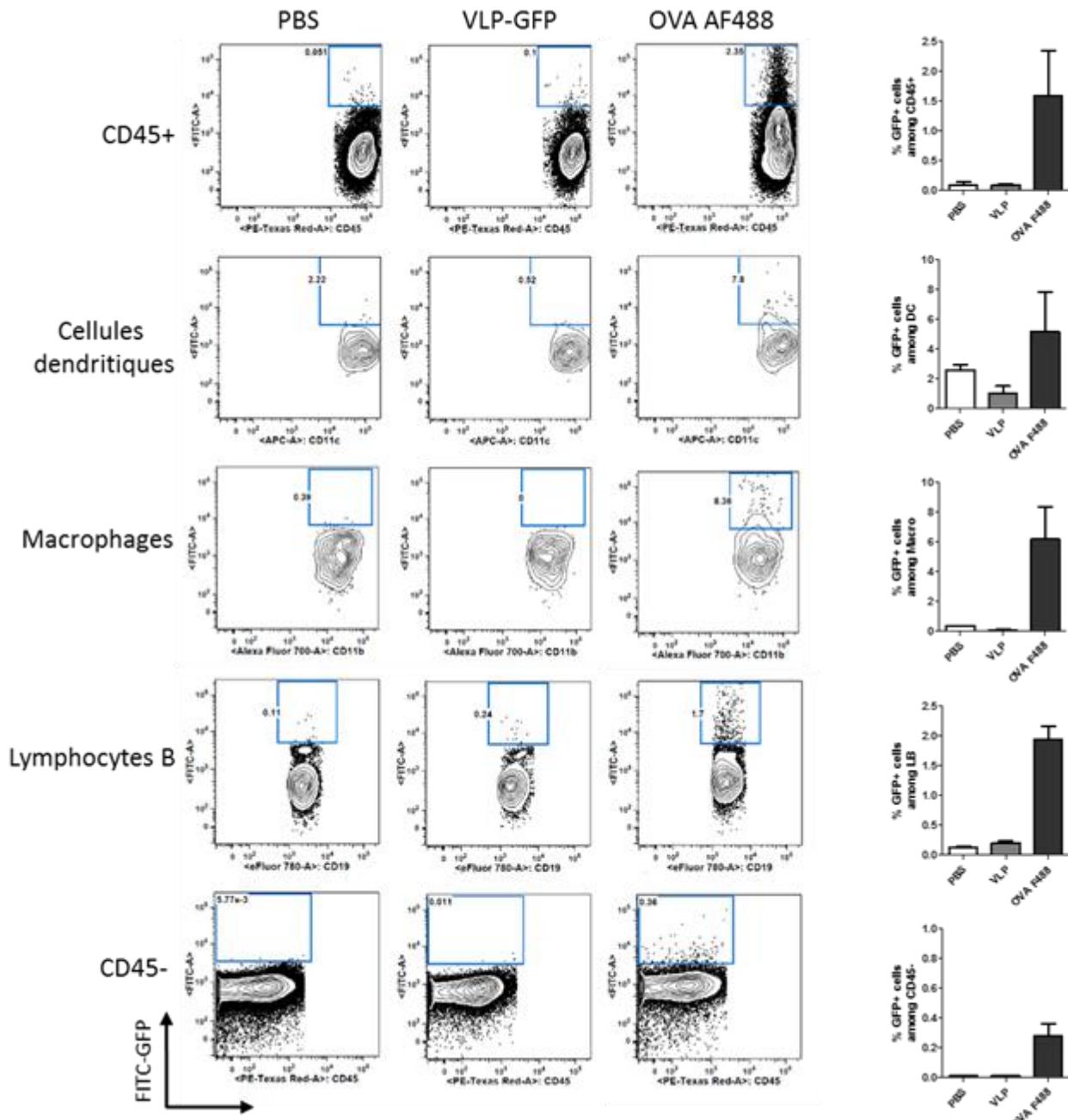
A**B**

Figure 16 : Capture *in vivo* des VLP-GFP par les cellules de l'intestin.

(A) Analyse par cytométrie en flux et avec le logiciel FlowJo des cellules de l'intestin, 12H après l'injection dans l'intestin de 100 μ L de PBS ou 100 μ g de VLP-GFP/VSVg ou 50 μ g d'OVA-488 (FITC) (2 souris par groupes). (B) Les cellules GFP+ sont représentées en pourcentage dans chaque population de cellules étudiées.

3. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules des poumons

Les résultats des expériences de capture des VLP-GFP dans les intestins nous ont conduits à réaliser une expérience dans un autre organe afin de valider l'approche expérimentale à pouvoir être capable d'observer par cytométrie en flux des cellules ayant captées nos VLP-GFP. Une cinétique de capture de VLP dans un modèle de vaccination intranasale ayant déjà été réalisée au laboratoire, nous avons donc choisi de faire une expérience sur les poumons. Des souris ont reçu une administration intranasale de 50 µL de PBS ou 50 µg de VLP-GFP/VSVg. Trois heures, 24 heures ou 72 heures après l'injection de VLP, les souris sont anesthésiées et des lavages broncho-alvéolaires (BAL) sont réalisés. Les cœurs de chaque souris sont ensuite perfusés en PBS pour éliminer le sang des tissus pulmonaires puis les poumons sont prélevés et traités pour une analyse en cytométrie des cellules.

a. Stratégie de définition des populations de cellules immunitaires des poumons

Dans un premier temps, les populations de cellules présentes dans les poumons et les BAL sont identifiées (Fig. 17A). Les cellules dendritiques (DC) et les macrophages alvéolaires (MacAlv) sont reconnus par les marqueurs IA/IE (CMH-II) et CD11c. Parmi les cellules IA/IE+ CD11c+, les anticorps anti-F4/80 et anti-Siglec F nous permettent de différencier les DC (F4/80-, SiglecF-) des MacAlv (F8/80+, SiglecF+). Sur les autres cellules, non identifiées comme étant des DC ou des MacAlv, les lymphocytes B (LB) sont reconnus par l'anticorps CD19 (CD19+, CD11b-). Les cellules CD11b restantes comprennent les éosinophiles (eosino), les neutrophiles (neutro) et les monocytes (mono). Les éosinophiles expriment le marqueur SiglecF tandis que les monocytes et neutrophiles sont identifiés par le marqueur Ly6C. La bonne sélection des populations de cellules est vérifiée par leur taille (FSC) et leur granulosité (SSC) (Fig. 17B).

Une première analyse est réalisée pour déterminer les proportions de chaque population de cellules identifiées dans les poumons (Fig. 17C). Les cellules présentatrices d'antigènes représentent 8% des cellules totales des poumons, 20% des cellules sont des lymphocytes B et 12% sont des granulocytes.

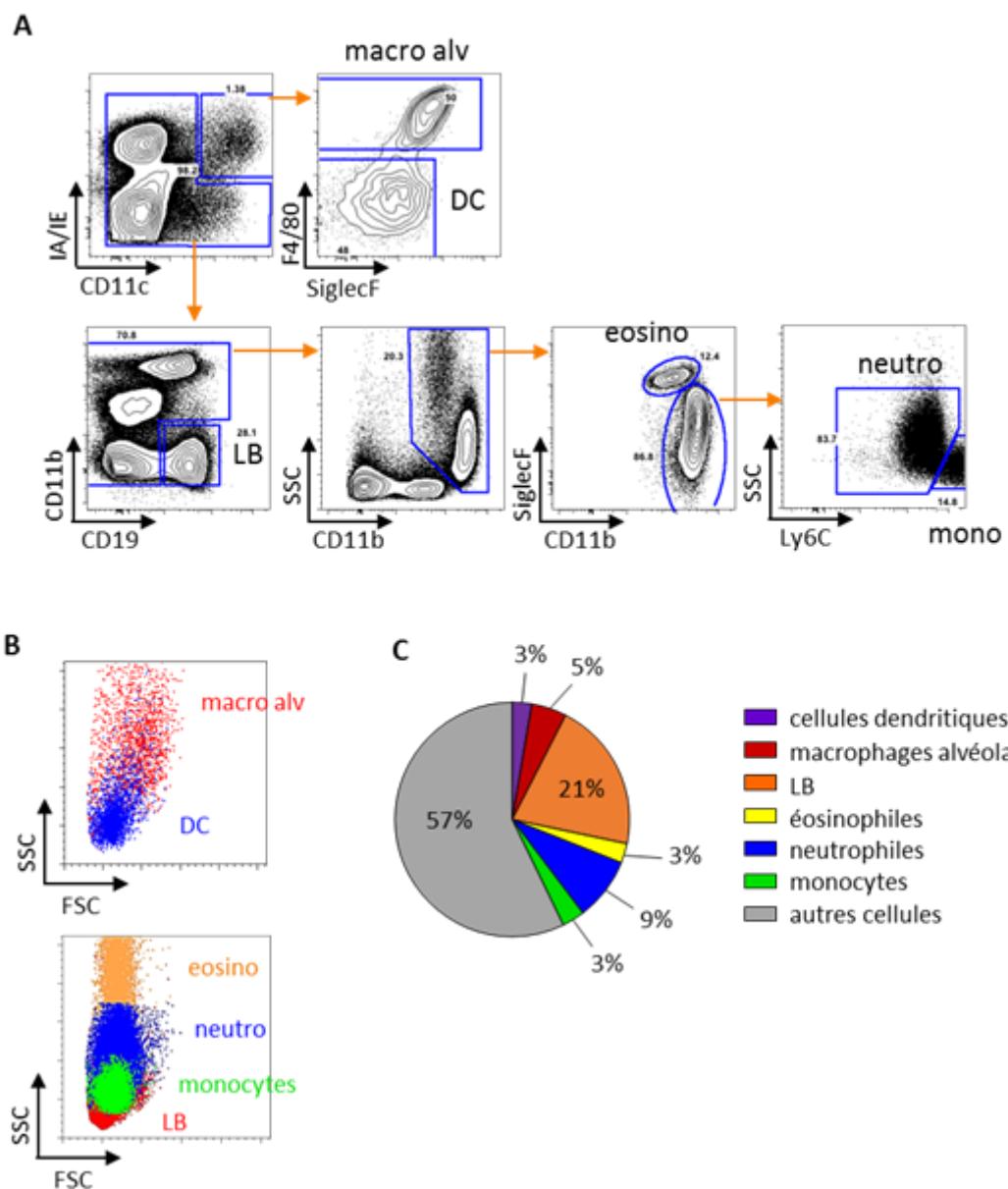


Figure 17 : Stratégie de définition des différentes populations de cellules immunitaires dans les poumons analysées avec le logiciel FlowJo.

(A) Les cellules dendritiques, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes B, les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes sont identifiés à l'aide des anticorps CD45, IA/IE, CD11c, F4/80, Siglec F, CD11b, CD19 et LyC6.

(B) Vérification en taille (FSC) et granulosité (SSC) des populations de cellules (C) Détermination de la répartition en pourcentages des populations de cellules identifiées présentes les poumons.

b. Capture in vivo des VLP-GFP par les cellules des poumons

La proportion de cellules GFP+ ayant captées les VLP-GFP est analysée pour chaque population de cellules identifiées et pour les trois temps de sacrifice (Fig. 18). 3 heures après l'administration des VLP-GFP, la majorité des VLP est capturée par les macrophages alvéolaires (38%) et par les cellules dendritiques (4%). Cependant, 48 heures et 72 heures après l'administration, les proportions de macrophages alvéolaires et de cellules dendritiques GFP+ diminuent fortement tandis que le pourcentage de neutrophiles GFP+ augmente jusqu'à 3%.

L'observation des cellules immunitaires ayant capté les VLP Gag-GFP/VSVg par cytométrie en flux est donc validée dans les poumons. Néanmoins, des étapes de mise au point sont encore nécessaires pour obtenir des résultats similaires pour les cellules des intestins.

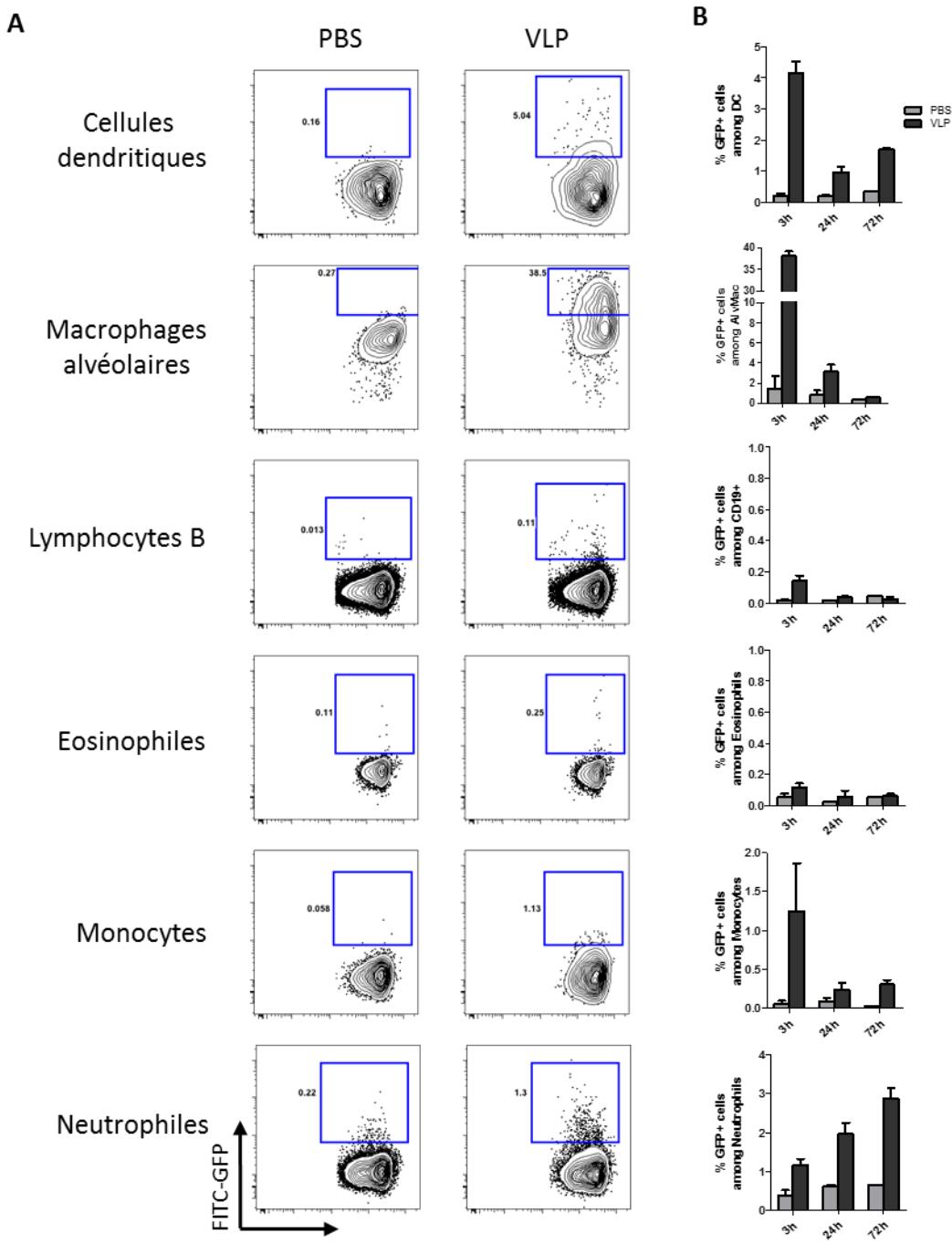


Figure 18 : Capture *in vivo* des VLP-GFP par les cellules des poumons

(A) Analyse par cytométrie en flux et avec le logiciel FlowJo des cellules des poumons, 3H après l'injection intranasale de 50µL de PBS ou 50 µg de VLP-GFP/VSVg. (B) Les cellules GFP+ sont représentées en pourcentage dans chaque population de cellules étudiées pour chaque temps de sacrifice après l'administration (3H, 24H et 72H).

4. Visualisation de la capture des VLP-GFP par immunofluorescence

Aucune cellule captant les VLP GFP n'ayant pu être observée par cytométrie en flux, nous avons voulu valider la présence de ces VLP dans les intestins par immunofluorescence. Plusieurs expériences ont été réalisées dans le but d'observer au microscope le phénomène de prise en charge des VLP-GFP par les cellules de l'intestin. Dans un premier temps, les souris sont gavées avec du PBS ou 200 µg de VLP-GFP et leurs intestins sont congelés une heure après le gavage. Des coupes de 5 µm sont réalisées au cryostat et les VLP-GFP sont détectées après marquage avec un anticorps anti-GFP afin d'amplifier la fluorescence des VLP. Plusieurs étapes de mise au point du protocole sont réalisées comme le lavage des intestins avant leur congélation qui nous ont permis d'éliminer la fluorescence dû au mucus de la lumière intestinale (Fig. 19A). Cependant, la présence de cellules fluorescentes dans les coupes d'intestins de souris gavées avec du PBS nous indique l'existence d'une fixation non spécifique des anticorps qui n'a pu être résolue.

La présence de cellules captant les VLP-GFP n'ayant pas pu être validée par cette technique d'immunofluorescence, nous avons réalisé une deuxième technique pratiquée au laboratoire. Des souris sont gavées avec du PBS ou 200 µg de VLP-GFP et les intestins fixés en PFA 4% cinq heures après le gavage puis conservés en sucre 30%. Des coupes de 80 µm sont réalisées au microtome et les VLP-GFP sont détectées après marquage avec un anticorps anti-GFP. Après plusieurs étapes de mise au point du protocole, des cellules fluorescentes dans les villosités des intestins de souris gavées avec du PBS sont observées témoignant de la fixation non spécifique des anticorps sur ces cellules (Fig. 19B). En parallèle, une expérience est réalisée sur des poumons : des souris reçoivent des injections intranasales de PBS ou de 50 µg de VLP-GFP et les poumons sont prélevés trois heures après l'administration et traités selon le même protocole (Fig. 19C). La présence de nombreuses cellules très fluorescentes dans les poumons de souris PBS et à un niveau similaire aux souris ayant reçu des VLP ne nous permet pas de conclure sur la présence de cellules ayant captées les VLP dans les poumons.

L'ensemble des expériences réalisées pour localiser par immunofluorescence la capture des VLP-GFP ne nous permet pas d'identifier ce phénomène ni dans les intestins ni dans les poumons et les protocoles nécessitent encore des optimisations.

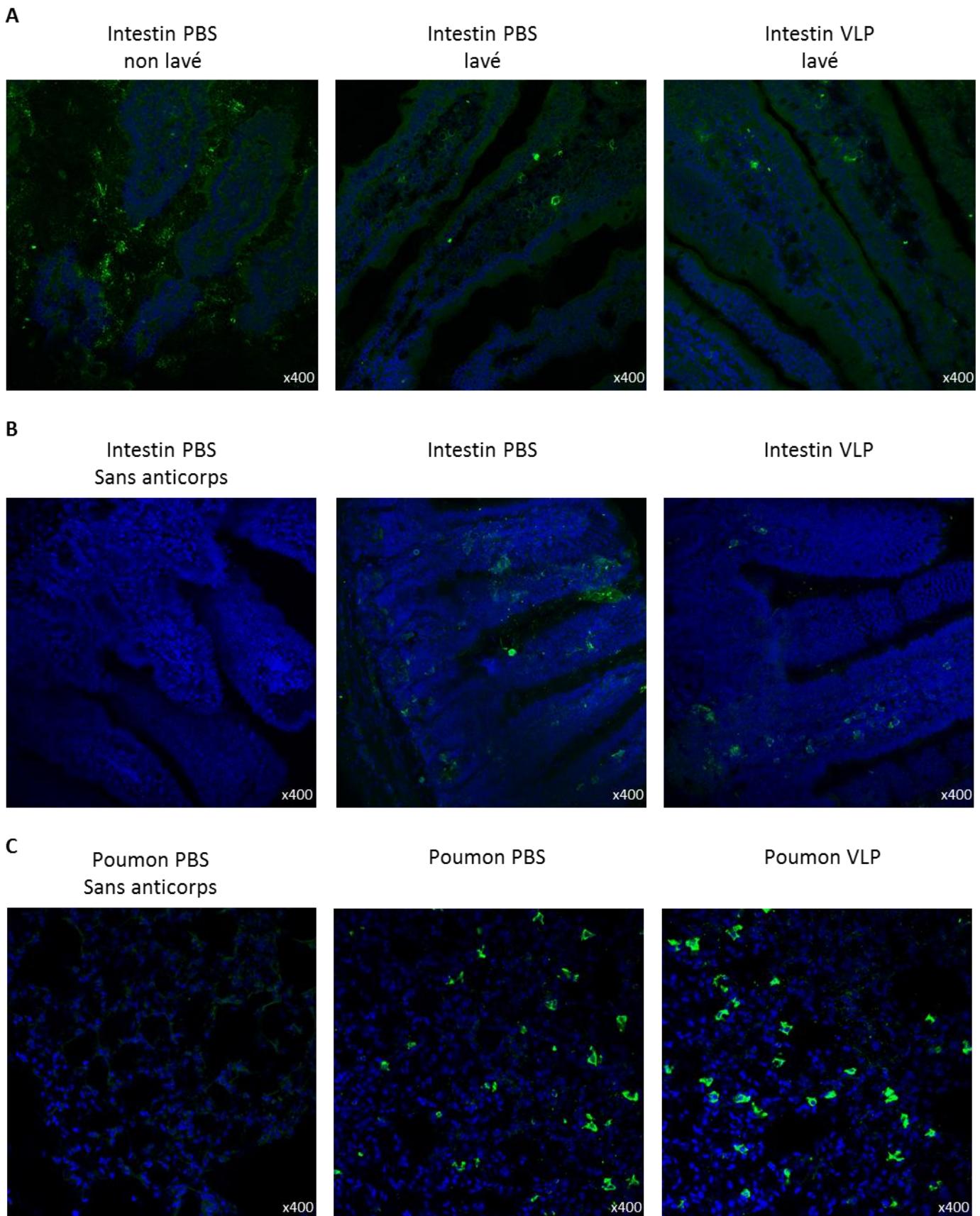


Figure 19 : Visualisation de la capture des VLP-GFP par immunofluorescence

Des coupes d'intestins de souris gavées avec 200 µL de PBS ou avec 200 µg VLP-GFP sont réalisées au cryostat (**A**) ou au microtome (**B**). Des coupes de poumons de souris ayant reçu des injections intranasales de 50 µL de PBS ou 50 µg de VLP-GFP sont réalisées au microtome (**C**). Les coupes sont marquées avec du Hoechst (noyaux des cellules) en bleu et avec un anti-GFP en vert. Les coupes marquées sont observées au microscope confocal inversé à l'objectif x40.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

I. Immunothérapie

Au cours de cette étude, nous avons testé une stratégie d'immunothérapie par voie orale utilisant un traitement par ADN dans un modèle d'étude d'allergie alimentaire à l'ovalbumine. L'allergène est administré en préventif en utilisant une stratégie de vaccination par des plasmoVLP combinés ou non avec des plasmides codant pour les cytokines IL-2 et IL-10. L'efficacité des traitements est évaluée par l'observation des scores cliniques et la perte de température. Des analyses sont effectuées sur le sang des souris en cours de protocole en complément d'une analyse de la réponse immunitaire et d'une analyse phénotypique des populations cellulaires de la rate, des ganglions MLN et des plaques de Peyer au terme des cycles d'inductions.

1. Modèle d'étude de l'allergie alimentaire

Les allergies alimentaires comprennent deux phases : une phase de sensibilisation et une phase d'induction. Ces deux phases sont reproduites dans un modèle murin d'allergie alimentaire à l'ovalbumine. La phase de sensibilisation est mimée par 2 injections d'immunisation et la phase d'induction est générée par l'administration orale de la protéine OVA. Dans notre laboratoire, nous avons adapté le protocole établi par Yamashita *et al* (Yamashita et al., 2012) et nous avons validé chez des souris BALB/cAnN sensibilisées, que l'administration fréquente de l'antigène par voie orale est responsable de l'apparition de diarrhées et d'une chute de température (Fig. 1). Nous avons pu aussi vérifier que la phase de sensibilisation est responsable de la perturbation de l'homéostasie systémique et locale et d'une induction d'une réponse Th2 (IL-4, IL-10, IgE et IgG1) alors que la phase d'induction contribue au recrutement de ces médiateurs. Ainsi ce modèle permet d'induire artificiellement une réponse allergique, chez des souris ne présentant pas naturellement de susceptibilité à l'allergie. Cependant, une hétérogénéité intra-groupe des scores et de la chute de température est observée dans nos expériences et le nombre d'inductions nécessaires pour induire l'allergie varie d'une expérience à une autre. Ces observations nous amènent à penser que la sensibilisation ou l'induction de l'allergie sont influencées par d'autres facteurs notamment des facteurs environnementaux.

2. Stratégie de traitement par ADN : les plasmoVLP

Dans notre laboratoire, il a été démontré un effet protecteur supérieur des plasmoVLP comparé à un traitement par de l'ADN codant pour la protéine OVA seule. En effet, les plasmoVLP sont plus immunogène que des vaccins à ADN ne formant pas de VLP et sont capables de stimuler les réponses humorales (Bellier et al., 2009) et cellulaires (Bellier et al., 2006) du système immunitaire. De plus, leur forme particulière leur permet une meilleure prise en charge par les cellules dendritiques par rapport à l'antigène soluble (Link et al., 2012). L'internalisation de l'antigène par les VLP peut être un avantage dans le cas des allergies alimentaires puisque les VLP diminuent le risque de pontage des IgE à la surface des mastocytes par des antigènes libres. Par l'activation des cellules dendritiques, les VLP orientent aussi les réponses immunitaires vers une réponse de type Th1, c'est pourquoi nous avons choisi un traitement par les plasmoVLP. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'IFN γ diminue les réponses Th2 et favorise la réponse Th1.

Nos résultats de vaccination par voie orale avec des plasmoVLP montrent une efficacité partielle lorsque les plasmides sont administrés en préventif. Plusieurs questions restent à éclaircir pour expliquer ces résultats notamment l'efficacité d'expression *in vivo* des plasmides et de la production des VLP. Les images de bioluminescence des plasmides administrés par voie orale (Fig. 2) révèlent une faible expression, localisée non au niveau des intestins mais au niveau de la cage thoracique. D'autres analyses doivent être réalisées pour déterminer plus précisément la localisation de l'expression des plasmides. Le manque d'efficacité des plasmoVLP pourrait, par ailleurs s'expliquer par le fait que les VLP produites *in vivo* sont en partie détruites par les enzymes de l'estomac, limitant ainsi leur accès aux intestins où les macrophages et les cellules dendritiques permettent l'induction d'une tolérance (Mazzini et al., 2014). Pour confirmer cette hypothèse, une expérience peut être réalisée *in vitro* en incubant des VLP avec des enzymes de l'estomac afin d'observer la lyse des VLP.

II. Mécanismes immunologiques

Au cours de cette étude, nous voulions identifier les populations de cellules impliquées dans la prise en charge des VLP produites *in vivo* au niveau de l'intestin grêle, dans le cadre de la stratégie d'immunothérapie de l'allergie alimentaire par voie orale avec des plasmoVLP.

Deux techniques ont été utilisées afin d'identifier les cellules immunitaires qui captent les VLP après leur administration orale. La première étude a été réalisée en cytométrie en flux afin d'obtenir une répartition en pourcentage des populations de cellules immunitaires qui captent les VLP fluorescentes. La seconde étude a été réalisée en recourant à une technique d'immunofluorescence dans le but d'observer au microscope ce phénomène de prise en charge des VLP.

1. Étude par cytométrie en flux

Lors de cette étude nous avons dans un premier temps utilisé un modèle *ex vivo*, c'est-à-dire injecté directement l'antigène dans des intestins de souris ligaturés et mis en culture à 37 °C pendant une heure, afin de valider notre stratégie d'identification des cellules capables de capter l'antigène. Les premières expériences ont été réalisées avec la protéine ovalbumine A488 (OVA-A488) en contrôle. Cette approche a été développée dans le but de simplifier la délivrance de l'antigène puisque l'injection directe de l'OVA-A488 dans les intestins évite son passage par le tractus intestinal et l'estomac. Cependant, d'autres problèmes techniques ont été rencontrés, notamment en ce qui concerne la survie des cellules (Annexe 2). Effectivement, pour éviter des différences de température entre le traitement des intestins et leur incubation à 37 °C pendant une heure, ceux-ci ne sont pas manipulés sur glace mais dans un milieu de culture préalablement chauffé à 37 °C. Ce procédé ne favorise pas la survie des cellules, d'autant plus que le temps nécessaire à la ligation des intestins aux deux extrémités et à l'injection des solutions est assez long, ce qui nous a conduit à abandonner ce modèle.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc utilisé un modèle *in vivo*, plus pertinent, qui consiste à gaver les souris avec les solutions contrôles (PBS et OVA-488) ou avec les VLP-GFP, puis à analyser la fluorescence dans les intestins après le gavage. Les résultats obtenus avec l'OVA-A488 nous ont permis de valider la détection d'antigènes de type protéique par cytométrie en flux et d'identifier les populations de cellules immunitaires qui captent cet antigène : dans les IEL, 70 % des cellules CD45+ ayant capté la protéine fluorescente sont des lymphocytes T. On suppose donc qu'il y a une fixation non spécifique de la protéine sur ces cellules puisque les LT ne peuvent pas prendre en charge activement les antigènes. Dans les

LPL, une majorité de macrophages et d'autres CPA captent l'OVA-A488 tandis que les cellules fluorescentes des PP sont principalement des lymphocytes B.

Cependant, lorsque l'on gave les souris avec les VLP-GFP, aucune cellule fluorescente n'est détectée par cytométrie en flux. Ce résultat est étonnant car les souris sont gavées avec 200 µg de VLP-GFP, soit deux fois plus que la quantité d'ovalbumine utilisée (100 µg). Cependant, la quantité de VLP-GFP utilisée pour gaver les souris n'est pas certaine. En effet, les VLP-GFP qui ont servi au gavage sont quantifiées par un kit de quantification des protéines totales ; or on sait que la solution de VLP, récupérée à la fin du protocole contient également des agrégats protéiques et/ou vésicules, comme les exosomes sécrétées par les cellules productrices. De ce fait, les 200 µg utilisés ne contiennent pas uniquement des VLP comme on le souhaiterait. Une autre hypothèse concerne la taille des VLP-GFP qui se situe entre 80 et 100 nm ce qui est 100 fois plus que la taille d'une protéine. Cette différence de taille peut alors influer sur le mécanisme de prise en charge de l'antigène par les cellules du système immunitaire muqueux, influençant notamment la cinétique de capture des antigènes. D'autre part et bien que les VLP issues du virus MLV soient résistantes à plusieurs détergents (Davidoff et al., 2012), nous n'excluons pas la possibilité que les VLPs soient dégradées par les enzymes de l'estomac. C'est pourquoi nous avons réalisé des expériences avec l'injection *in vivo* des VLP-GFP directement dans les intestins chez des souris anesthésiées, mais les résultats obtenus ne sont pas différents de ceux obtenus par gavage. Une autre hypothèse peut être émise : l'intensité de fluorescence de la GFP servant à détecter les VLP est plus faible que le fluorochrome A488 et sensible au pH acide (Haupts et al., 1998) contrairement à l'AF488 dont la fluorescence n'est pas affectée par le pH entre 4 et 10. La GFP contenue par les VLP est donc plus facilement dégradable que le fluorochrome A488 couplé à l'ovalbumine, ce qui pourrait justifier qu'aucune cellule GFP n'a pu être détectée pour les souris ayant reçu les VLP-GFP. L'ajout d'un marquage intra cellulaire avec anti-GFP afin d'augmenter le signal de fluorescence de la GFP n'a donné aucun résultat concluant.

Pourtant, l'expérience réalisée sur les poumons nous a permis de valider les outils puisque nous avons pu détecter par cytométrie en flux des cellules immunitaires ayant capté les VLP-GFP. Contrairement aux administrations de VLP-GFP orales où les VLP peuvent être dégradées par les enzymes du tractus digestif et sont diffusées à travers les différents

organes du tube digestif (œsophage, estomac, intestin grêle et colon), les VLP-GFP administrées par des injections intranasales sont concentrées dans les lobes des poumons, ce qui facilite l'observation de leur capture par les cellules résidentes (macrophages alvéolaires, cellules dendritiques et neutrophiles).

De ces expériences, nous pouvons conclure que le protocole d'observation de cellules captant les VLP-GFP par cytométrie en flux est validé dans les poumons mais doit être adapté aux intestins.

2. Étude par immunofluorescence

Suite aux résultats peu concluants de l'étude par cytométrie en flux des populations de cellules immunitaires qui captent les VLP-GFP, nous avons orienté nos recherches vers une technique d'immunofluorescence. En nous basant sur des résultats d'immunofluorescence obtenus avec des particules fluorescentes par d'autres laboratoires (Primard et al., 2010), nous avons congelé, une heure après l'administration orale de VLP-GFP, un morceau du duodénum de l'intestin et réalisé des immunomarquages (Fig. 13A). Les résultats obtenus ne nous ont pas permis d'observer la prise en charge des VLP-GFP par les cellules de l'intestin puisque des cellules fluorescentes sont observées dans les intestins de souris PBS. Ces mêmes cellules sont retrouvées dans les coupes marquées avec l'anticorps secondaire seul, ce qui nous indique que cet anticorps se fixe de façon non spécifique sur des cellules de la lamina propria des villosités des intestins. Des solutions de lait 5%, de BSA 1 à 3%, de lysine 0,1 M et de 24G2 ont été testées pour saturer et bloquer les récepteurs Fc présents à la surface de certaines cellules et responsables de fixations aspécifiques des anticorps. D'autres solutions de blocage restent encore à tester pour éliminer les fixations non spécifiques, notamment le sérum de chèvre puisque l'anticorps secondaire anti-chicken couplé au fluorochrome AF488 est produit chez la chèvre.

D'autre part, la probabilité d'observer la capture des VLP-GFP par les cellules de l'intestin est sûrement faible puisqu'on suppose qu'il s'agit d'événements rares étant donné notre difficulté à l'observer par cytométrie en flux. C'est pourquoi nous avons choisi une seconde méthode d'immunofluorescence qui permet de réaliser des coupes plus épaisses afin d'étudier des portions d'intestins plus grandes. Les coupes au microtome, d'une épaisseur de 80 µm au lieu de 5 µm au cryostat, sont ensuite photographiées au microscope confocal

tous les 5 µm de profondeur afin d'observer toutes les cellules de la coupe. Malgré les problèmes liés aux fixations non spécifiques de l'anticorps secondaire, les coupes PBS et VLP sont similaires et donc ne permettent pas l'observation de capture de VLP-GFP. Une expérience sur les poumons est réalisée en parallèle trois heures après l'administration des VLP-GFP, temps pour lequel on a pu observer par cytométrie en flux le plus de cellules captant les VLP-GFP. Alors que dans l'intestin la présence des VLP n'a pu être validée, la présence des cellules ayant capté les VLP dans les poumons est certaine mais n'a pas pu être observée par cette technique d'immunofluorescence à cause d'un trop grand nombre de cellules fluorescentes aspécifiques.

Des optimisations des protocoles d'immunofluorescence sont nécessaires pour permettre d'observer *in situ* la localisation des cellules qui capturent les VLP-GFP dans l'intestin grêle. Par la suite, des co-marquages pourront être réalisés afin d'identifier des co-localisations entre les cellules ayant capté les VLP-GFP en vert (FITC) et les cellules immunitaires identifiées par les anticorps CD11b (cellules dendritiques), F4/80 (macrophages) et B220 (lymphocytes B) en rouge (A594) (Annexe 3). Nous nous intéresserons également aux cellules M puisque ces cellules, présentes dans la couche de cellules épithéliales au niveau des plaques de Peyer sont décrites pour favoriser le transport de l'antigène vers celles-ci. Il existe un anticorps ciblant les cellules M (anti-M cell specific mouse mAb *MBL international corporation*) dont nous avons déjà testé la spécificité et qui nous permettra d'observer au microscope si les VLP-GFP traversent plus facilement la barrière muqueuse au niveau de ces cellules.

L'identification des cellules captant les rétroVLP est nécessaire pour mieux comprendre le mécanisme global de mise en place des réponses immunitaires face aux plasmoVLP. Qu'il s'agisse des cellules M ou bien des cellules du système immunitaire, les cellules prenant en charge les rétro-VLP pourront alors être ciblées afin d'améliorer la stratégie d'immunothérapie de l'allergie alimentaire étudiée par notre équipe.

III. L'association des plasmoVLP avec pIL2 ou pIL10

Les mécanismes de rupture de la tolérance orale à l'origine des allergies alimentaires ne sont pas encore clairement élucidés mais il a été rapporté une diminution du nombre et de l'efficacité des Treg chez les personnes allergiques (Ling et al., 2004). On sait également que

l'administration orale d'antigène induit dans les intestins des Treg sécréteurs d'IL-10 et de TGF- β qui inhibent les symptômes et les réponses allergiques (Smaldini et al., 2015). L'utilisation des cytokines IL-2 et IL-10 permettrait de stimuler les lymphocytes Treg (Churlaud et al., 2014; Murai et al., 2009) pour rééquilibrer la balance entre les Teff et les Treg, qui est en faveur des Teff au cours de l'allergie, dans le but de diminuer les symptômes allergiques et d'augmenter la tolérance vis-à-vis des allergènes alimentaires.

Dans nos résultats, l'ajout des plasmides codant pour les cytokines IL-2 et IL-10 augmente l'efficacité thérapeutique des plasmoVLP (Fig. 4, Fig. 6, Fig. 7). Cependant 78 jours après le traitement, ces plasmides ne semblent pas modifier les proportions de Treg localement dans les plaques de Peyer ni dans les ganglions drainants (Fig. 4). Au niveau systémique, on n'observe qu'une légère augmentation du pourcentage de Treg dans la rate pour le groupe pVLP+pIL10 mais qui s'accompagne d'une diminution d'activation de ces cellules. Ce compartiment Treg est analysé 10 semaines après la fin du traitement, ce qui nous amène à penser que les proportions de Treg ou leur activation ont pu être influencées par le traitement, mais ces modifications ne sont plus observables à J83. Dans les figures 6 et 7, la déplétion des Treg par le PC61 avant la phase de sensibilisation annule les effets thérapeutiques des traitements administrés en préventif. Les Treg pourraient donc avoir un rôle dans les premières phases de l'allergie, c'est-à-dire pendant la phase de sensibilisation ou pendant les premiers cycles d'induction.

Lorsque l'on s'intéresse aux cellules B mémoires sécrétrices d'IgE, on remarque que seul l'ajout du pIL10 (groupe pVLP+pIL10) permet une diminution partielle du pourcentage de cellules sécrétrices d'IgE comparé au pourcentage de ces cellules chez les souris sensibles tandis que le pIL2 ne semble pas modifier ces pourcentages. Pourtant, ces deux groupes de souris (pVLP+pIL2 et pVLP+pIL10) sont protégés à un niveau équivalent des signes cliniques (score) et de la chute de température (Fig. 4B. induction 3.1). Les mécanismes impliqués dans la protection de l'allergie ne semblent donc pas dépendre des proportions de cellules B mémoires et sécrétrices d'IgE et semblent différents lorsque les plasmoVLP sont associés avec du pIL2 ou du pIL10. L'IL-2 est connue pour son action préférentielle sur les lymphocytes T et les cellules NK (Gaffen and Liu, 2004; Marçais et al., 2013) tandis que l'IL-10 agit sur de nombreuses cellules du système immunitaire inné et adaptatif (Bhattacharyya et al., 2004; Ding and Shevach, 1992). En effet, le récepteur à l'IL-10 est exprimé à l'état basal

par la plupart des cellules hématopoïétiques mais peut être surexprimé par certaines cellules lorsqu'elles sont activées (Huber et al., 2011). Le récepteur à l'IL-10 est également exprimé par des cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales de l'intestin diminuant la perméabilité intestinale (Denning et al., 2000). De nombreux mécanismes d'action de ces plasmides codant pour les cytokines IL-2 et IL-10 peuvent être impliqués pour permettre la mise en place d'une tolérance orale et la protection contre l'allergie mais ces mécanismes restent à définir.

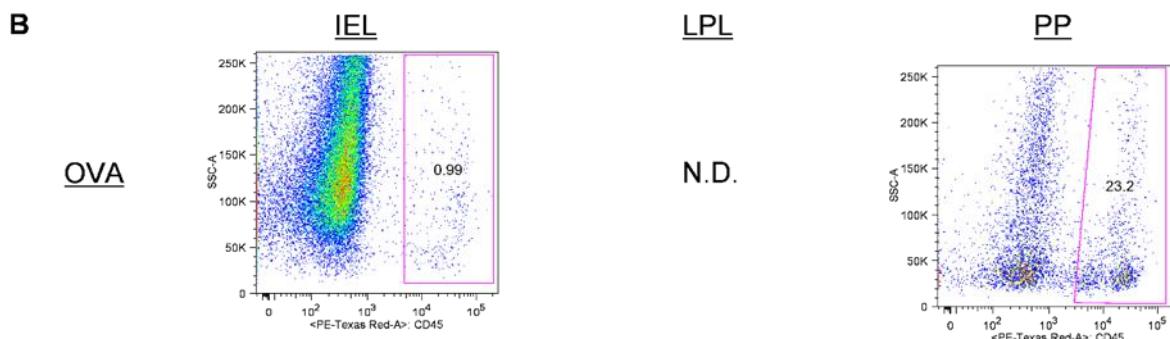
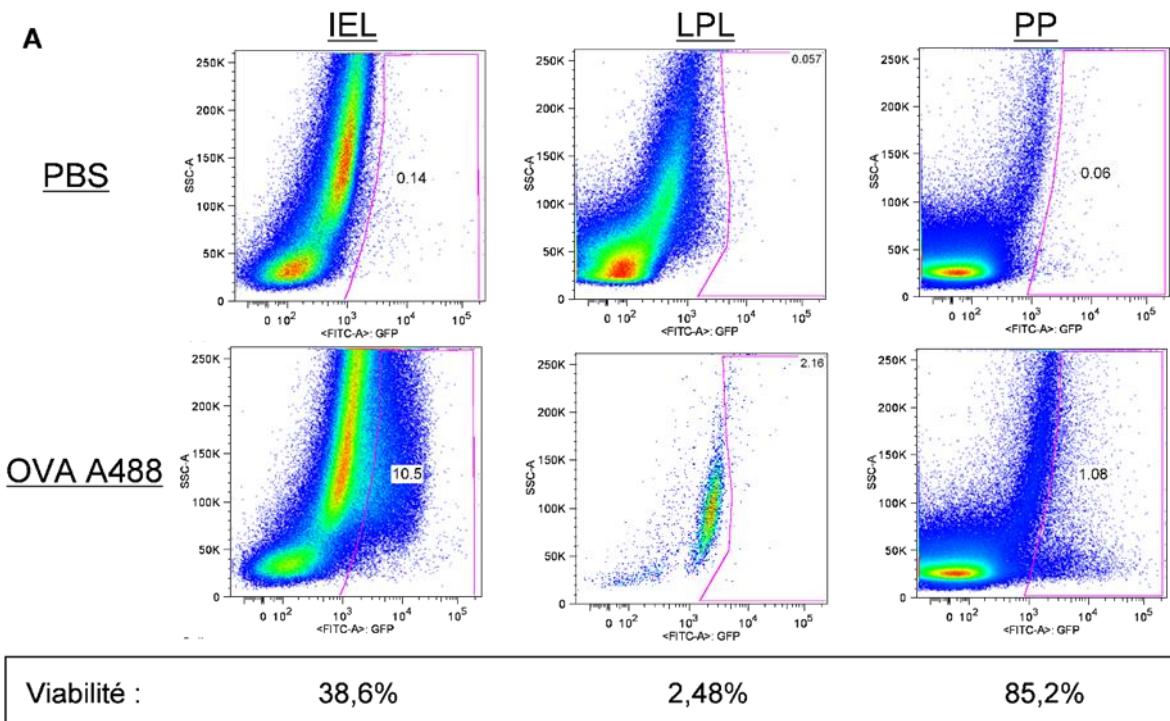
Cependant, les effets des plasmides pIL2 et pIL10 peuvent aussi être dû en partie à l'ajout d'ADN et des CpG contenus dans la structure du plasmide. Pour différencier les effets dus à l'ADN des effets dus aux cytokines IL-2 et IL-10, une expérience peut être réalisée suivant le même protocole avec un groupe de souris traitées avec du plamoVLP associé à du pncDNA. Les effets de ce traitement sur les populations cellulaires pourront ensuite être comparés au groupe pVLP+pIL2 et pVLP+pIL10. Par ailleurs, l'ajout d'un anticorps anti-IL-10 dans un groupe traité avec pVLP+pIL10 permettrait également de répondre à cette question.

Au vu de l'ensemble des résultats d'immunothérapie, l'association des pVLP à la dose de 50 µg avec les plasmides pIL2 et pIL10 semble offrir une protection durable dans le temps contre les symptômes de l'allergie alimentaire. Ces résultats doivent être reproduits et d'autres analyses sont nécessaires pour mieux caractériser les mécanismes d'action de ces plasmides. Enfin, le moment du traitement de l'allergie constitue un point important. Nous avons utilisé ici des traitements préventifs afin de définir la capacité du traitement à maintenir une tolérance orale quand vient la phase de sensibilisation. Cependant, des traitements préventifs ne peuvent pas être appliqués aux patients puisqu'il est difficile de prédire à quels allergènes les individus vont réagir. Le traitement devra donc être testé dans un protocole curatif (après un cycle d'induction) afin de définir si cette association de plasmides permet de restaurer une tolérance et non pas simplement de la maintenir.

ANNEXES

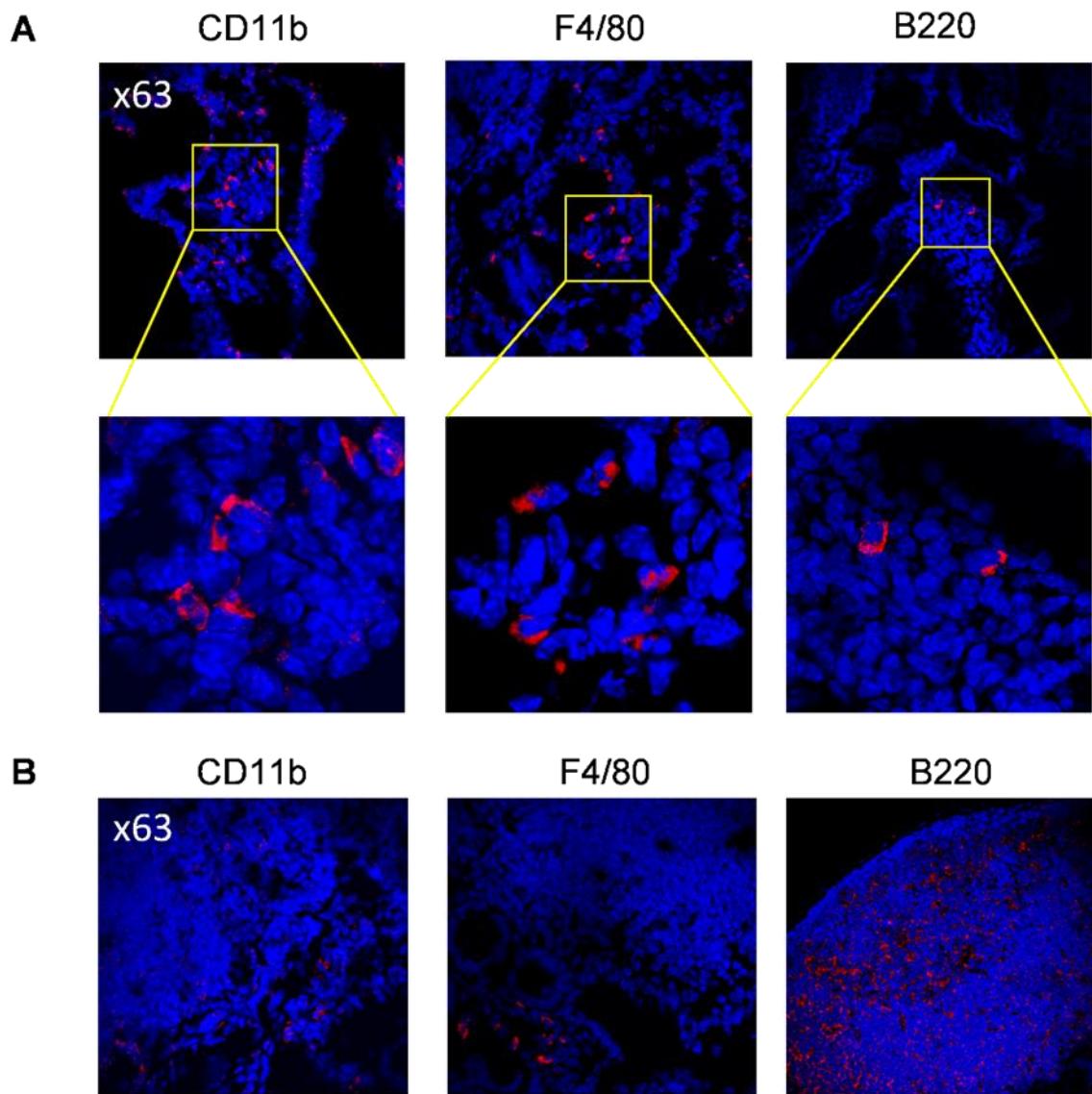
Spécificité	Fluorochrome	Clone
CD3	PE	145-2C11
CD4	V500	RM4-5
CD8	Alexa Fluor 700	53-6.7
CD11b	Alexa Fluor 700	M1/70
CD11c	APC	HL3
CD19	PE CF564	1D3
CD19	APC e780	1D3
CD25	PE-Cy7	PC61
CD45	PE CF564	30-F11
CD45R (B220)	PB	RA3-6B2
CD63	APC	NVG-2
CD103	Biotin	M290
CD117 (C-Kit)	eFluor450	2B8
CD200R	PE	OX110
CD278 (ICOS)	APC	C398.4A
F4/80	eFluor450	BM8
Fc ϵ RI	eFluor450	MAR-1
Foxp3	eFluor450	FJK-16s
IA/E	V500	M5/114.15.2
IgD	APC	11-26c
IgE	Biotin	
IgM	PE-Cy7	11/41
KI67	FITC	35/KI-67
Ly6C	PE-Cy7	AL-21
NK1.1	Biotin	PK136
SiglecF	PE	E50-2440
Streptavidine	APC-e780	

Annexe 1 : Tableau des anticorps utilisés en cytométrie de flux



Annexe 2 : Capture de l'ovalbumine A488 par les cellules de l'intestin dans le modèle ex vivo.

(A) Résultat de l'analyse avec le logiciel FlowJo de chaque tissu : IEL (colonne de gauche), LPL (colonne du centre) et PP (colonne de droite) pour des intestins injectés avec l'OVA-A488 (ligne supérieure) ou du PBS (ligne inférieure). Les cellules sont représentées en fonction de leur granulosité (SSC-A) en ordonnée, et de leur fluorescence (A488) en abscisse. (B) Identification des cellules immunitaires (CD45+) présentes parmi les cellules fluorescentes.



Annexe 3 : Visualisation des cellules immunitaires par immunofluorescence.

Observation au microscope confocal des cellules dendritiques (CD11b), des macrophages (CD11b, F4/80) et des lymphocytes B (B220) dans les villosités (**A**) et dans les plaques de Peyer (**B**). En bleu, du Hoechst marque les noyaux de cellules ; tandis que la fluorescence des anticorps anti-CD11b, anti-F4/80 et anti-B220 est visible en rouge.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **102**, 98–106.
- Andrawiss, M., Takeuchi, Y., Hewlett, L., and Collins, M. (2003). Murine leukemia virus particle assembly quantitated by fluorescence microscopy: role of Gag-Gag interactions and membrane association. *J. Virol.* **77**, 11651–11660.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341.
- Bager, P., Wohlfahrt, J., and Westergaard, T. (2008). Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 634–642.
- Bellier, B., Dalba, C., Clerc, B., Desjardins, D., Drury, R., Cosset, F.-L., Collins, M., and Klatzmann, D. (2006). DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. *Vaccine* **24**, 2643–2655.
- Bellier, B., Huret, C., Miyalou, M., Desjardins, D., Frenkiel, M.-P., Despres, P., Tangy, F., Dalba, C., and Klatzmann, D. (2009). DNA vaccines expressing retrovirus-like particles are efficient immunogens to induce neutralizing antibodies. *Vaccine* **27**, 5772–5780.
- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Rosemblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* **204**, 1765–1774.
- Bhattacharyya, S., Sen, P., Wallet, M., Long, B., Baldwin, A.S., and Tisch, R. (2004). Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood* **104**, 1100–1109.
- Blázquez, A.B., and Berin, M.C. (2008). Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J. Immunol. Baltim. Md* **180**, 4441–4450.
- Bour-Jordan, H., Grogan, J.L., Tang, Q., Auger, J.A., Locksley, R.M., and Bluestone, J.A. (2003). CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat. Immunol.* **4**, 182–188.
- Ceponis, P.J., Botelho, F., Richards, C.D., and McKay, D.M. (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J. Biol. Chem.* **275**, 29132–29137.
- Chackerian, B. (2007). Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* **6**, 381–390.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886.
- Chen, X., Song, C.-H., Liu, Z.-Q., Feng, B.-S., Zheng, P.-Y., Li, P., In, S.H., Tang, S.-G., and Yang, P.-C. (2011). Intestinal epithelial cells express galectin-9 in patients with food allergy that plays a critical role in sustaining allergic status in mouse intestine. *Allergy* **66**, 1038–1046.

- Chiang, D., and Berin, M.C. (2015). An Examination of Clinical and Immunologic Outcomes in Food Allergen Immunotherapy by Route of Administration. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **15**, 35.
- Chu, D.K., Llop-Guevara, A., Walker, T.D., Flader, K., Goncharova, S., Boudreau, J.E., Moore, C.L., In, T.S., Waserman, S., Coyle, A.J., et al. (2013). IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 187–200.e8.
- Chu, D.K., Jimenez-Saiz, R., Verschoor, C.P., Walker, T.D., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Shen, P., Gordon, M.E., Barra, N.G., Bassett, J.D., et al. (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J. Exp. Med.* **211**, 1657–1672.
- Churlaud, G., Jimenez, V., Ruberte, J., Amadoudji Zin, M., Fourcade, G., Gottrand, G., Casana, E., Lambrecht, B., Bellier, B., Piaggio, E., et al. (2014). Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **151**, 114–126.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764.
- Davidoff, C., Payne, R.J., Willis, S.H., Doranz, B.J., and Rucker, J.B. (2012). Maturation of the Gag core decreases the stability of retroviral lipid membranes. *Virology* **433**, 401–409.
- Denning, T.L., Campbell, N.A., Song, F., Garofalo, R.P., Klimpel, G.R., Reyes, V.E., and Ernst, P.B. (2000). Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int. Immunol.* **12**, 133–139.
- Denning, T.L., Wang, Y., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* **8**, 1086–1094.
- Descotes, J., and Choquet-Kastylevsky, G. (2001). Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology* **158**, 43–49.
- Ding, L., and Shevach, E.M. (1992). IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol. Baltim. Md* **148**, 3133–3139.
- Dubois, B., Joubert, G., Gomez de Agüero, M., Gouanvic, M., Goubier, A., and Kaiserlian, D. (2009). Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* **137**, 1019–1028.
- Frati, F., Moingeon, P., Marcucci, F., Puccinelli, P., Sensi, L., Di Cara, G., and Incorvaia, C. (2007). Mucosal immunization application to allergic disease: sublingual immunotherapy. *Allergy Asthma Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc.* **28**, 35–39.
- Frossard, C.P., Tropia, L., Hauser, C., and Eigenmann, P.A. (2004). Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 958–964.
- Fukaya, T., Takagi, H., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Taya, H., Shin, T., Chen, L., Dong, C., Azuma, M., et al. (2010). Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* **116**, 2266–2276.

Gaffen, S., and Liu, K. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109–123.

Gamazo, C., Gastaminza, G., Ferrer, M., Sanz, M.L., and Irache, J.M. (2014). Nanoparticle based-immunotherapy against allergy. *Immunotherapy* 6, 885–897.

Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M.P., et al. (2008). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29, 771–781.

Gupta, R., Sheikh, A., Strachan, D.P., and Anderson, H.R. (2007). Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 62, 91–96.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237–246.

Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., and Webb, W.W. (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13573–13578.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550–564.

Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G.K., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.-L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113–117.

Hill, D.A., Siracusa, M.C., Abt, M.C., Kim, B.S., Kobuley, D., Kubo, M., Kambayashi, T., Larosa, D.F., Renner, E.D., Orange, J.S., et al. (2012). Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat. Med.* 18, 538–546.

Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., et al. (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34, 554–565.

Huret, C., Desjardins, D., Miyalou, M., Levacher, B., Amadoudji Zin, M., Bonduelle, O., Combadière, B., Dalba, C., Klitzmann, D., and Bellier, B. (2013). Recombinant retrovirus-derived virus-like particle-based vaccines induce hepatitis C virus-specific cellular and neutralizing immune responses in mice. *Vaccine* 31, 1540–1547.

Jacob, C., Yang, P.-C., Darmoul, D., Amadesi, S., Saito, T., Cottrell, G.S., Coelho, A.-M., Singh, P., Grady, E.F., Perdue, M., et al. (2005). Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *J. Biol. Chem.* 280, 31936–31948.

Jenkins, S.J., Perona-Wright, G., Worsley, A.G.F., Ishii, N., and MacDonald, A.S. (2007). Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 179, 3515–3523.

Johansson, S.G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A., Platts-Mills, T.A., and Ring, J. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 832–836.

Jutel, M., Müller, U.R., Fricker, M., Rihs, S., Pichler, W.J., and Dahinden, C. (1996). Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **26**, 1112–1118.

Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1187–1197.

Larché, M., Akdis, C.A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 761–771.

Di Leo, V., Yang, P.-C., Berin, M.C., and Perdue, M.H. (2002). Factors regulating the effect of IL-4 on intestinal epithelial barrier function. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 219–227.

Lescailla, G., Pitoiset, F., Macedo, R., Baillou, C., Huret, C., Klatzmann, D., Tartour, E., Lemoine, F.M., and Bellier, B. (2013). Efficacy of DNA vaccines forming e7 recombinant retroviral virus-like particles for the treatment of human papillomavirus-induced cancers. *Hum. Gene Ther.* **24**, 533–544.

Li, T.C., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M.A., Uchida, T., Takeda, N., and Miyamura, T. (1997). Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J. Virol.* **71**, 7207–7213.

Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet Lond. Engl.* **363**, 608–615.

Ling, Z., Li, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Tong, X., Yuan, L., Wang, Y., Sun, J., Li, L., et al. (2014). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2546–2554.

Link, A., Zabel, F., Schnetzler, Y., Titz, A., Brombacher, F., and Bachmann, M.F. (2012). Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 3724–3733.

Llop-Guevara, A., Chu, D.K., Walker, T.D., Goncharova, S., Fattouh, R., Silver, J.S., Moore, C.L., Xie, J.L., O'Byrne, P.M., Coyle, A.J., et al. (2014). A GM-CSF/IL-33 pathway facilitates allergic airway responses to sub-threshold house dust mite exposure. *PLoS One* **9**, e88714.

Magnan, A., and Humbert, M. (2005). Is deficient tolerance the true paradigm for atopic diseases? *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **35**, 1507–1510.

Marçais, A., Viel, S., Grau, M., Henry, T., Marvel, J., and Walzer, T. (2013). Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front. Immunol.* **4**, 450.

Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Miletí, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* **59**, 595–604.

- Maynard, C.L., Hatton, R.D., Helms, W.S., Oliver, J.R., Stephensen, C.B., and Weaver, C.T. (2009). Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and IL10 genes in developing regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 343–357.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity* **40**, 248–261.
- Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2008). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* **63**, 1455–1463.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**, 1923–1933.
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* **10**, 1178–1184.
- Niggemann, B., Staden, U., Rolinck-Werninghaus, C., and Beyer, K. (2006). Specific oral tolerance induction in food allergy. *Allergy* **61**, 808–811.
- Van Panhuys, N., Klauschen, F., and Germain, R.N. (2014). T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo. *Immunity* **41**, 63–74.
- Pereira-Santos, M.C., Baptista, A.P., Melo, A., Alves, R.R., Soares, R.S., Pedro, E., Pereira-Barbosa, M., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2008). Expansion of circulating Foxp3+)D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **38**, 291–297.
- Piliponsky, A.M., Gleich, G.J., Bar, I., and Levi-Schaffer, F. (2002). Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol. Immunol.* **38**, 1369–1372.
- Prescott, S.L., Pawankar, R., Allen, K.J., Campbell, D.E., Sinn, J.K., Fiocchi, A., Ebisawa, M., Sampson, H.A., Beyer, K., and Lee, B.-W. (2013). A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ. J.* **6**, 21.
- Primard, C., Rochereau, N., Luciani, E., Genin, C., Delair, T., Paul, S., and Verrier, B. (2010). Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells. *Biomaterials* **31**, 6060–6068.
- Van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* **201**, 981–991.
- Ring, S., Schäfer, S.C., Mahnke, K., Lehr, H.-A., and Enk, A.H. (2006). CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2981–2992.

- Roduit, C., Frei, R., Depner, M., Schaub, B., Loss, G., Genuneit, J., Pfefferle, P., Hyvärinen, A., Karvonen, A.M., Riedler, J., et al. (2014). Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 1056–1064.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., et al. (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 638–646.
- Roy, P., and Noad, R. (2009). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Adv. Exp. Med. Biol.* *655*, 145–158.
- Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., et al. (2013). A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* *210*, 2939–2950.
- Schöll, I., Untersmayr, E., Bakos, N., Roth-Walter, F., Gleiss, A., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., and Jensen-Jarolim, E. (2005). Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 154–160.
- Senti, G., von Moos, S., Tay, F., Graf, N., Johansen, P., and Kündig, T.M. (2015). Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. *Allergy* *70*, 707–710.
- Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* *259*, 88–102.
- Sicherer, S.H. (2011). Epidemiology of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 594–602.
- Sicherer, S.H., and Sampson, H.A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 291–307.e5.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Hill, D.A., Kim, B.S., Headley, M.B., Doering, T.A., Wherry, E.J., Jessup, H.K., Siegel, L.A., Kambayashi, T., et al. (2011). TSLP promotes interleukin-3-independent basophil hematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* *477*, 229–233.
- Smaldini, P.L., Orsini Delgado, M.L., Fossati, C.A., and Docena, G.H. (2015). Orally-Induced Intestinal CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg Controlled Undesired Responses towards Oral Antigens and Effectively Dampened Food Allergic Reactions. *PLOS ONE* *10*, e0141116.
- Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat. Immunol.* *9*, 310–318.
- Temchura, V.V., Tenbusch, M., Nchinda, G., Nabi, G., Tippler, B., Zelenyuk, M., Wildner, O., Uberla, K., and Kuate, S. (2008). Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus. *Vaccine* *26*, 3662–3672.
- Theoharides, T.C., Aly sandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., et al. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1822*, 21–33.
- Travers, J., and Rothenberg, M.E. (2015). Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* *8*, 464–475.

Troncone, R., Caputo, N., Florio, G., and Finelli, E. (1994). Increased intestinal sugar permeability after challenge in children with cow's milk allergy or intolerance. *Allergy* **49**, 142–146.

Turner, H., and Kinet, J.P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**, B24–B30.

Untersmayr, E., Schöll, I., Swoboda, I., Beil, W.J., Förster-Waldl, E., Walter, F., Riemer, A., Kraml, G., Kinaciyan, T., Spitzauer, S., et al. (2003). Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 616–623.

Vazquez-Ortiz, M., Alvaro, M., Piquer, M., Dominguez, O., Machinena, A., Martín-Mateos, M.A., and Plaza, A.M. (2014). Baseline specific IgE levels are useful to predict safety of oral immunotherapy in egg-allergic children. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **44**, 130–141.

Vereda, A., van Hage, M., Ahlstedt, S., Ibañez, M.D., Cuesta-Herranz, J., van Odijk, J., Wickman, M., and Sampson, H.A. (2011). Peanut allergy: Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 603–607.

Wang, J., and Sampson, H.A. (2011). Food allergy. *J. Clin. Invest.* **121**, 827–835.

Watanabe, M., Watanabe, S., Hara, Y., Harada, Y., Kubo, M., Tanabe, K., Toma, H., and Abe, R. (2005). ICOS-mediated costimulation on Th2 differentiation is achieved by the enhancement of IL-4 receptor-mediated signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 1989–1996.

Van Wijk, F., Hoeks, S., Nierkens, S., Koppelman, S.J., van Kooten, P., Boon, L., Knippels, L.M.J., and Pieters, R. (2005). CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 174–179.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 519–527.

Xiao, C., Puddicombe, S.M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., Haitchi, H.M., Vernon-Wilson, E., Sammut, D., Bedke, N., et al. (2011). Defective epithelial barrier function in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **128**, 549–556.e1–e12.

Yamashita, H., Takahashi, K., Tanaka, H., Nagai, H., and Inagaki, N. (2012). Overcoming food allergy through acquired tolerance conferred by transfer of Tregs in a murine model. *Allergy* **67**, 201–209.

Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* **19**, 739–748.

Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C.J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J.F., Guo, L., and Paul, W.E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat. Immunol.* **5**, 1157–1165.

(2015). OMS | Organisation mondiale de la Santé.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la vie et de la terre

**IMMUNOTHÉRAPIE DE L'ALLERGIE ALIMENTAIRE ET ÉTUDE
DES MÉCANISMES IMMUNOLOGIQUES ASSOCIÉS**

Faustine BRIMAUD

Soutenu le 29 janvier 2016

L'allergie est devenue un problème de santé majeur puisque depuis quelques années, la prévalence des maladies liées à l'allergie a fortement augmenté dans les pays industrialisés. L'allergie alimentaire se caractérise par une hypersensibilité développée contre des protéines allergéniques présentes dans les aliments. Certaines des réactions allergiques sont graves et peuvent parfois être mortelles comme les chocs anaphylactiques. À l'heure actuelle, le seul moyen de traiter les allergies est l'immunothérapie spécifique de l'allergène (ITS). L'ITS est déjà pratiquée pour soigner certaines allergies, notamment respiratoires. Mais l'immunothérapie pour soigner des allergies alimentaires reste encore du domaine de la recherche. L'induction de tolérance du système immunitaire à un allergène par voie orale semble être aujourd'hui une approche prometteuse.

Notre laboratoire a développé une stratégie d'immunothérapie de l'allergie alimentaire par voie orale, en utilisant des plasmides codant pour des pseudo-particules virales (VLP) qui protègent l'antigène à délivrer. Ces particules, capables d'induire des réponses immunitaires de type Th1 peuvent être utilisées pour contrer les réponses allergiques (réponse Th2). Nous avons testé des optimisations de la stratégie d'immunothérapie en associant les plasmides codant pour les VLP (plasmoVLP) avec des plasmides codant des cytokines immunorégulatrices ; telles l'IL-2 et l'IL-10. Nous avons montré que l'association des plasmoVLP avec les pIL2 et pIL10 administré en préventif améliore les effets thérapeutiques des plasmoVLP chez la souris et permet une protection contre les signes cliniques jusqu'à neufs semaines après la fin du traitement.

En parallèle, nous avons cherché à caractériser les mécanismes par lesquels le système immunitaire muqueux de l'intestin capte les antigènes, en particulier les VLP. Nous avons développé des outils qui permettent de suivre les VLP rendues fluorescentes et validé par cytométrie en flux et par microscopie confocale l'approche expérimentale notamment après administration au niveau des poumons. Par contre, nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques pour reproduire ce type de résultats dans les intestins. Ce travail a néanmoins permis de mettre au point de nouvelles techniques jusqu'alors non utilisées au laboratoire et qui permettront de mieux caractériser les mécanismes immunologiques mis en jeu lors de l'induction d'une tolérance contre les allergènes alimentaires.

Mots clés : allergie alimentaire, ADN plasmidiques, immunothérapie, vectorisation d'antigène, adjuvants cytokiniques, microscopie fluorescence.