



Article original

Sensibilisation parentérale du lapin aux protéines du lait de vache : effets sur la perméabilité intestinale

The parenteral sensitization of rabbit to cow's milk protein: effects on the intestinal permeability

N. Ayad^{a,*}, B. Hellal^a, M. Maatoug^b^a Faculté des sciences, université Dj.-Liabes, 14, rue H.-Zoubeir-Ibn-El-Aouem, 22000 Sidi Bel'Abbes, Algérie^b Faculté des sciences, université de Tiaret, 14000 Tiaret, Algérie

Accepté le 10 octobre 2006

Résumé

But. – Étudier les mécanismes de l'intolérance aux protéines du lait de vache, pour préciser l'importance de la perméabilité intestinale à la β -lactoglobuline et à l' α -lactalbumine chez les lapins sensibilisés à ces deux protéines.

Méthodes. – Les lapins ont été sensibilisés à la β -lactoglobuline et à l' α -lactalbumine par voie parentérale et leur degré d'immunisation a été établi par dosage Elisa des IgG spécifiques. Pour l'étude des échanges transépithéliaux, l'interaction des protéines (marquées au ^{14}C -formol), avec la muqueuse intestinale de lapins sensibilisés et des témoins a été suivie in vitro sur des fragments d'iléons montés en chambre de Ussing. Leurs flux transépithéliaux ont été mesurés, après stimulation par les protéines déposées dans le compartiment muqueux, à partir de prélèvements effectués du côté séreux.

Résultats. – Les animaux sensibilisés présentent des titres en IgG anti β -lactoglobuline et anti α -lactalbumine ainsi que des flux transépithéliaux significativement plus élevés que ceux des témoins.

Conclusion. – Ces résultats suggèrent que chez les animaux immunisés, l'interaction de la protéine sensibilisante avec la muqueuse intestinale provoque des anomalies de transport hydroélectrolytiques.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Objectives. – Study of the cow's milk protein intolerance mechanisms in order to knowledge, in which could proportions spread the permeability of intestinal to the β -lactoglobulin and α -lactalbumin at the rabbits sensitized to these two proteins.

Methods. – The rabbits were sensitized to these proteins by subcutaneous way and their degree of immunization established by Elisa dosage of the specific IgG. For the study of the transepithelial exchanges, the interaction of the proteins (marked to the ^{14}C -formol), with the mucous intestinal of sensitized and some control rabbits were follow-up in vitro on fragments of ileums mounted in Ussing chamber. Their transepithelial fluxes were measured, after stimulation by the proteins deposited in the mucous compartment from a sampling made from serosa side.

Results. – The animals sensitized present some titers in IgG anti β -lactoglobulin and anti α -lactalbumin, as well as some transepithelial fluxes, significantly more increased than control animals.

Conclusion. – These results suggests that at the immunized animals, the interaction of the sensitizing protein with intestinal mucous caused some anomalies of hydroelectrolytic transport.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant. Département de biologie, faculté des sciences, boulevard Larbi-Ben-M'Hidi, 22000 Gambetta, Sidi Bel'Abbes, Algérie.

Adresses e-mail : helayad_b@yahoo.fr (N. Ayad), maatoug_m@yahoo.fr (M. Maatoug).

Mots clés : α -lactalbumine ; β -lactoglobuline ; Perméabilité ; intestinale ; Sensibilisation

Keywords: α -lactalbumin; β -lactoglobulin; Permeability; intestinal; Sensitization

1. Introduction

L'expérience professionnelle suggère que la fréquence de l'intolérance aux protéines du lait de vache (IDLV) semble en augmentation et qu'il existerait de façon concomitante, une diminution de la capacité de digestibilité des protéines du lait de vache, ces notions pouvant être liées à une modification de la perméabilité de la muqueuse intestinale vis-à-vis du transport épithélial [1,2]. Cependant, l'expression clinique de l'IPLV est souvent précoce avec une prépondérance des manifestations digestives (diarrhées, vomissements, constipation, réflexe gastropharage, malabsorption grave, gastroentéropathie à éosinophiles) [3] et des symptômes extradiigestifs (choc anaphylactique, urticaire, asthme). Ces perturbations sont transitoires et disparaissent après l'exclusion du lait de vache.

Sur le plan fondamental, l'IPLV est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale aux protéines au stade aigu de la maladie. Cependant, le mécanisme par lequel les protéines du lait de vache déclenchent la sécrétion intestinale reste inconnu. Ce travail a été engagé afin d'étudier l'interaction des protéines majeures du lactosérum de lait de vache avec l'épithélium intestinal de lapins sensibilisés.

Dans ce contexte, les animaux sont dans un premier temps, sensibilisés par voie parentérale à deux protéines incriminées dans l'IPLV : la β -lactoglobuline (β -LG) et l' α -lactalbumine (α -LA) afin d'étudier in vitro l'interaction de ces antigènes avec leur muqueuse intestinale. Les objectifs de cette étude sont doubles :

- sur le plan fondamental, préciser l'interaction de ces protéines avec la muqueuse intestinale d'animaux sensibilisés comparés à des tensions ;
- sur le plan clinique, apporter des éléments à la compréhension de l'allergénicité des protéines du lait de vache.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux et immunisation

Deux groupes de six lapins de race néo-zélandaise, pesant entre 2 et 3 kg, sont immunisés contre la β -LG et l' α -LA par injection sous-cutanée en plusieurs points, le long de la colonne vertébrale, de 2 mg de protéine dissoute dans 0,5 ml de sérum physiologique et émulsionnée avec 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (Sigma[®]). Les animaux non sensibilisés ont servi de témoins. La même procédure, mais avec seulement 1 mg de protéine émulsionnée cette fois avec 0,5 ml d'adjuvant incomplet de Freund est répétée au 7, 20 et 30^e jours après la première injection. Deux jours plus tard, le sérum est testé pour établir les titres sériques en anticorps anti β -LG et anti α -LA et stocké à -80 °C jusqu'à utilisation [4].

2.2. Dosage par Elisa des IgG sériques

Les titres en anticorps IgG anti β -LG et IgG anti α -LA des sérums de lapins immunisés après dilution au 1/100 sont établis par la méthode Elisa [5].

2.3. Étude des échanges transépithéliaux en chambre de Ussing

L'interaction des protéines avec la muqueuse intestinale de lapins témoins et immunisés est approchée en mesurant les flux transépithéliaux (du côté muqueux au côté séreux) de ces protéines. Ces paramètres sont mesurés en chambre de Ussing permettant de présenter, de part et d'autre, une surface de l'intestin exposée sur 0,10 ou 0,13 cm². Les deux faces du tissu déterminent deux compartiments, muqueux et séreux, chacun rempli avec 2 ml d'une solution de Ringer (pH 7,4). Le système est carbogéné et thermostaté à 37 °C avec un mélange gazeux (95 % O₂ et 5 % CO₂).

2.4. Marquage des protéines du lactosérum de vache

Le marquage des protéines (β -LG et α -LA du lait de vache, Sigma[®]) est effectué par alkylation réductive au formaldéhyde marqué au ¹⁴Carbone (¹⁴C) (Amersham[®], France – A.S = 500 μ Ci/mM), en présence de cyanoborohydrure de sodium purifié (NaCNBH₃, Merck[®]), selon la technique de Jentoft et Dearborn [6]. La protéine est alors dissoute dans une solution de Ringer à la concentration de 2 mg/ml, aliquotée et congelée à -80 °C.

2.5. Mesure des flux transépithéliaux des macromolécules

L'animal, maintenu à jeun depuis la veille au soir, est anesthésié avec une dose de pentobarbital sodique à 6 %. Après laparotomie, un fragment d'iléon est monté à plat entre les deux demi-chambres de Lucite (surface exposée : 0,10 ou 0,13 cm²). Après stabilisation du système, la protéine marquée au ¹⁴C est introduite dans le compartiment muqueux, à la concentration de 1 mg/ml de façon à obtenir une activité totale de 3,5 10⁶ cpm environ. Les flux sont effectués en circuit ouvert.

Des prélèvements de 800 μ l sont effectués du compartiment séreux à 20 minutes d'intervalle (10 à 150 minutes) et remplacés par du Ringer frais dont 500 μ l qui sont utilisés pour la mesure du flux total de la protéine intacte et dégradée (nanogrammes par heure par centimètre carré), utilisant la photométrie à scintillation liquide (Kontron[®], SL4000), alors que les 300 μ l restants sont congelés en vue de déterminer le taux de la protéine intacte par dosage enzymatique (Elisa).

2.6. Mesure du ^{14}C extrait du tissu

À la fin de chaque expérience, les tissus sont récupérés dans une solution de mannitol froid (0,3 M) et plongés trois minutes après, dans une solution d'acide nitrique (0,1 N), afin de solubiliser les tissus et en extraire toute la radioactivité fixée (exprimée en équivalent ^{14}C -protéine (ng/cm² de muqueuse)).

2.7. Analyse statistique

Elle est réalisée en utilisant le test de comparaison des moyennes, le test de Student « t » pour des données non appariées.

3. Résultats

3.1. Dosage des IgG par Elisa

Le titre en IgG anti β -LG est de 1/18155° alors que celui en IgG anti α -LA est de 1/12589° (Fig. 1). Il n'y a pas de différence significative entre ces deux titres. Chez les animaux témoins non sensibilisés, les anticorps dirigés contre la β -LG et l' α -LA ne sont pas détectables. Les résultats obtenus indiquent des titres élevés en anticorps anti β -LG et anti α -LA, montrant clairement que les animaux présentent un degré élevé de sensibilisation à ces deux protéines.

4. Étude de l'accumulation et des flux transépithéliaux de la β -LG et de l' α -LA

4.1. Accumulation en fonction du temps

L'accumulation en fonction du temps de ces protéines dans le compartiment séreux des tissus des animaux sensibilisés et de ceux des témoins (Fig. 2) est une fonction linéaire au cours du temps puisqu'elle montre une corrélation positive haute-

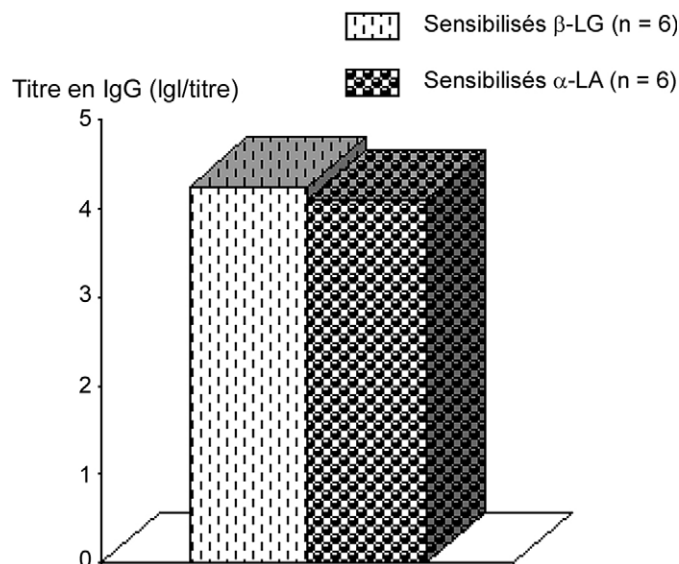


Fig. 1. Titres en IgG anti β -LG et anti α -LA, mesurés par la technique Elisa chez les lapins sensibilisés à la β -LG et α -LA.

ment significative ($p < 0,001$) des deux protéines en fonction du temps, chez tous les groupes des animaux utilisés :

- Chez les animaux sensibilisés à la β -LG et dont les tissus sont stimulés par la β -LG :

$$y = 5,69x - 29,43 \quad (r = 0,64)$$

- Chez les animaux sensibilisés à l' α -LA et dont les tissus sont stimulés par l' α -LA :

$$y = 4,09x + 0,87 \quad (r = 0,63)$$

- Chez les animaux témoins non sensibilisés :

Tissus stimulés par la β -LG :

$$y = 3,21x - 61,06 \quad (r = 0,77)$$

Tissus stimulés par l' α -LA : $y = 4,00x - 37,50 \quad (r = 0,60)$

Le Tableau 1 montre, d'une part, que le transport de la β -LG et de l' α -LA par les tissus sensibilisés est significativement plus élevé que chez les témoins ($p < 0,001$) et, d'autre part, que l'accumulation de la β -LG est significativement plus élevée ($p < 0,001$) que celle de l' α -LA, aussi bien chez les animaux sensibilisés que chez les témoins.

4.2. Comparaison de l'évolution des flux transépithéliaux ($\text{Jm}^{-1}\text{s}^{-1}$) en fonction du temps

Le flux de la β -LG et l' α -LA est significativement plus élevé chez les animaux sensibilisés à l'une de ces deux protéi-

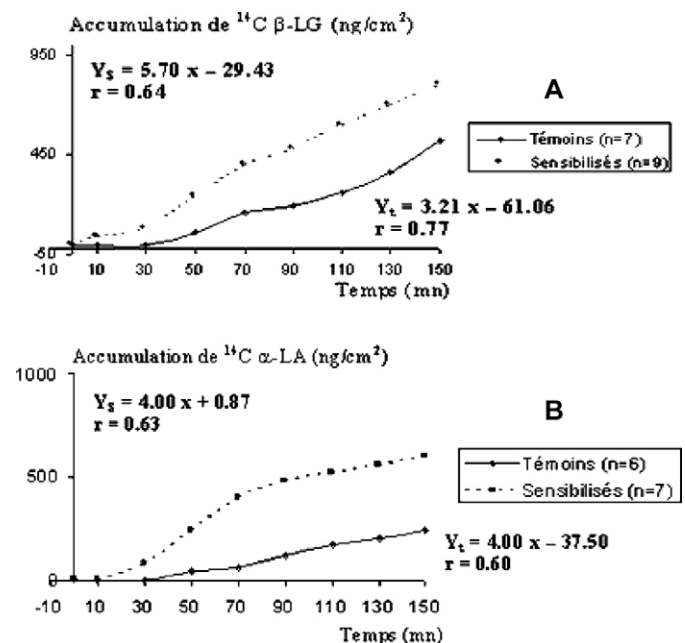


Fig. 2. Accumulation en fonction du temps de la radioactivité dans le compartiment séreux, après introduction de ^{14}C β -LG (A) et de ^{14}C α -LA (B) sur le versant muqueux d'iléons de lapins sensibilisés à l'une des deux protéines et de lapins témoins, montés en chambre de Ussing.

Tableau 1

Accumulation dans le compartiment séreux de ^{14}C β -LG et de ^{14}C α -LA après 150 minutes d'étude

Accumulation	Tissus (iléon) de lapins		
	Sensibilisés		Témoins
^{14}C β -LG (1)	3958 ($\pm$ 993) $n = 9$	$p < 0,001$	1613 ($\pm$ 273) $n = 7$
^{14}C α -LA (2)	2809 ($\pm$ 602) $n = 7$	$p < 0,001$	1213 ($\pm$ 223) $n = 6$
P (1/2)	$p < 0,001$		$p < 0,001$

Tableau 2

Quantité de ^{14}C extrait des tissus (iléon) de lapins ayant été en contact avec les protéines radiomarquées

	^{14}C β -LG		^{14}C α -LA
Tissus sensibilisés (1)	3968 ($\pm$ 829) $n = 12$	$p < 0,001$	2109 ($\pm$ 425) $n = 9$
Tissus témoins (2)	4453 ($\pm$ 668) $n = 10$	$p < 0,001$	2195 ($\pm$ 300) $n = 10$
P (1/2)	NS		NS

que la ^{14}C - β -LG se fixe beaucoup plus que la ^{14}C - α -LA sur les deux types de tissus.

5. Discussion

Nos résultats montrent que les flux transépithéliaux moyens de la β -LG et de l' α -LA mesurés sur les tissus des animaux sensibilisés à l'une de ces deux protéines sont significativement supérieurs à ceux des tissus des animaux témoins. Le flux de la β -LG, mesuré in vitro, en chambre de Ussing sur les tissus des animaux témoins, concorde avec celui rapporté par Marcon-Genty et al., [7] pour cette protéine sur l'iléon de lapin. Cela est en accord avec les données de la littérature qui établissent clairement l'absorption de faibles quantités de protéines par l'épithélium intestinal d'animaux adultes, au cours d'études in vitro et in vivo [8,9].

Le mécanisme de ce passage transépithélial décrit par Stern et Walker [10] implique une perméabilité intestinale élevée aux protéines chez les animaux sensibilisés par rapport aux témoins, avec une sélectivité dans le transport selon la nature de la protéine. En effet, le passage transépithélial total de l' α -LA est fortement réduit par rapport à celui de la β -LG, dans les deux groupes d'animaux. Il suggère le rôle possible de la masse moléculaire des protéines comme le proposent certains auteurs [11]. Puisque le poids moléculaire de la β -LG est peu différent de celui de l' α -LA, il y a donc lieu de considérer que la sélectivité de l'intestin par rapport aux protéines est en relation avec leur structure et leurs propriétés antigéniques comme le suggèrent plusieurs auteurs [12–14], la β -LG est considérée comme la protéine majeure du lactosérum impliquée dans l'intolérance au lait de vache, et peut garder une configuration stable en milieu acide [15]. Par ailleurs, sa structure moléculaire antigénique est maintenue par des ponts dissulfures intramoléculaires avec au moins quatre sites antigéniques [16].

Les résultats donnent à penser que le transport total des protéines est inversement proportionnel à leur taux de fixation sur la muqueuse intestinale : par conséquent plus le flux de passage est grand, moins la fixation est importante, ce qui concorde avec les résultats rapportés par Marcon-Genty et al. [17] sur des iléons de lapins montés en chambre de Ussing et stimulés par des caséines natives et des caséines modifiées au formaldéhyde, montrant que la sensibilisation intrapéritonéale des animaux à des protéines augmente sensiblement la perméabilité intestinale aux macromolécules. Ces données sont en accord avec les résultats d'Heyman et al. [17,18] qui montrent une augmentation de l'absorption de la peroxydase au niveau des biopsies jéjunales d'enfants intolérants aux protéines du lait de vache et de fragments d'iléons de cobayes sensibilisés au

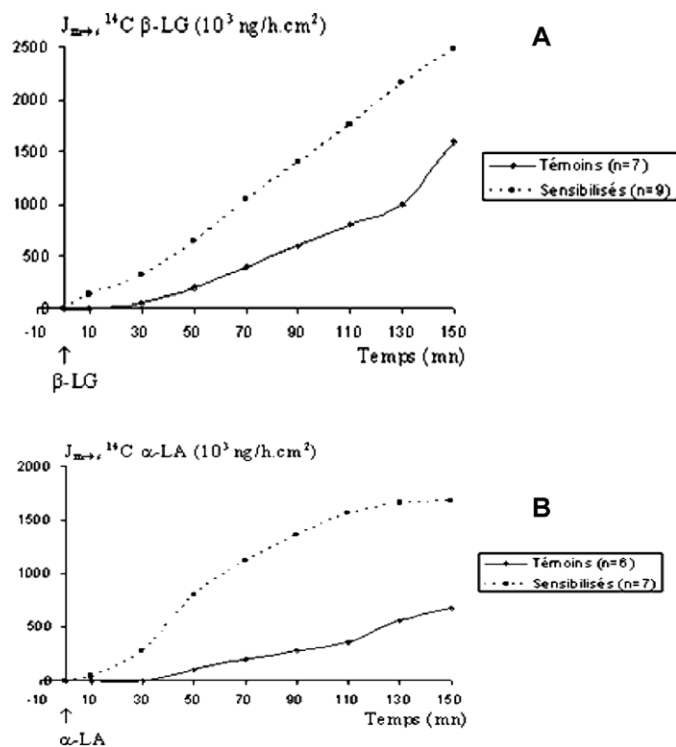


Fig. 3. Comparaison de l'évolution en fonction du temps du flux de la radioactivité dans le compartiment séreux, après introduction de β -LG (A) et de α -LA (B), sur le versant muqueux d'iléons de lapins sensibilisés à l'une des deux protéines et de lapins témoins, montés en chambre de Ussing.

nes par rapport aux témoins ($p < 0,001$) (Fig. 3) ; en revanche la comparaison des flux montre que celui de la β -LG est significativement plus élevé que celui de l' α -LA, aussi bien chez les animaux sensibilisés que chez les témoins.

Ces deux protéines sont transportées au niveau des tissus d'animaux sensibilisés en proportions supérieures à celles des tissus d'animaux témoins ($p < 0,001$) (Tableau 1).

4.3. Mesure du ^{14}C extrait des tissus

La quantité de chacune des deux protéines extraites des tissus sensibilisés est équivalente à celle des tissus témoins (Tableau 2). Cependant, la radioactivité extraite correspondant à la ^{14}C - β -LG est significativement plus importante que celle correspondant à la ^{14}C - α -LA, aussi bien sur les tissus d'animaux sensibilisés ($p < 0,001$) que sur ceux des témoins ($p < 0,001$). Cela montre qu'une très faible quantité des deux protéines marquées au ^{14}C , traverse l'épithélium intestinal et

lait de vache. Cependant, on ne peut exclure un possible passage sous forme intacte de la β -LG et l' α -LA puisqu'il a été observé une augmentation du passage du macromolécules sous forme intacte sur des tissus de rats sensibilisés aux gliadines et à l'ovalbumine [19–21] ainsi que sur des tissus de cobaye sensibilisés au lait de vache [18].

6. Conclusion

Cette étude a permis d'évaluer l'effet de la sensibilisation parentérale aux principales protéines du lactosérum du lait de vache, sur la perméabilité de l'intestin (iléon) de lapin à la β -LG et à l' α -LA et d'établir les titres en IgG sériques dirigés spécifiquement contre ces protéines. Le dosage des IgG anti β -LG et anti α -LA montre, chez les animaux sensibilisés, des titres plus élevés que chez les témoins. De plus, l'étude in vitro des échanges transépithéliaux montre que le flux d'accumulation de ces protéines est significativement plus élevé chez les animaux sensibilisés que chez les témoins. Ce modèle expérimental qui propose l'utilisation des protéines du lactosérum incriminées dans l'IPLV constitue une approche intéressante pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'IPLV chez l'enfant. Nos résultats confirment bien certaines données de la littérature qui expliquent le mécanisme de la diarrhée chez l'enfant atteint d'IPLV, survenant lorsque leur muqueuse intestinale est en contact avec les allergènes du lait de vache.

Références

- [1] Caillard I, Tomé D. Transport des antigènes protéiques majeurs du lactosérum bovin dans l'épithélium intestinal. *Cah Nutr Diet* 1995;5:306.
- [2] Heyman M, Desjeux JF. Rôle de l'épithélium digestif dans le transfert des protéines du lait. *Cah Nutr Diet* 1996;1:19.
- [3] Thumerelle C, Santos C, Chartier A, Michaud L, Guimber D, Deschildre A. Les présentations cliniques atypiques des allergies aux protéines du lait de vache du nourrisson : à propos de quatre observations. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2001;4:407–11.
- [4] Isolauri E, Gotteland M, Heyman M, Pochart P, Desjeux JF. Antigen absorption in rabbit bacterial diarrhea (RDEC-1). In vitro modifications in Ileum patches. *Dig Dis Sci* 1990;35:360–6.
- [5] Engwall E, Pearlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Elisa. *J Immunol* 1972;1:129–35.
- [6] Jentoft N, Dearborn DG. Labeling of protein by reductive methylation using sodium cyanoborohydride. *J Biol Chem* 1979;254:4359–65.
- [7] Marcon-Genty D, Tomé D, Kheroua O, Dumontier AM, Heyman M, Desjeux JF. Transport of β -lactoglobulin across rabbit ileum in vitro. *Am J Physiol* 1989;256:943–8.
- [8] Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* 1974;66:987–92.
- [9] Heyman M, Ducroc R, Desjeux JF, Morgat JL. Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am J Physiol* 1982;242:558–64.
- [10] Stern M, Walker WA. Food proteins and gut mucosal barrier. I- Binding and uptake of cow's milk proteins by adult rat jejunum in vitro. *Am J Physiol* 1984;246:556–62.
- [11] Brandtzaeg P, Tolo K. Mucosal penetrability enhanced by serum derived antibodies. *Nature* 1977;266:262–3.
- [12] Pearson JP, Kingston D, Shiner M. Antibody production to milk proteins in the jejunal mucosa of children with cow's milk protein intolerance. *Pediatr Res* 1983;17:406–12.
- [13] Huang Q, Culeman JW, Stanworth D. Investigation of the allergenicity of β -lactoglobulin and its cleavage fragments. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;78:337–44.
- [14] Saavedra-Delgado AM, Metcalfe DD. Interactions between food antigens and the immune system in the pathogenesis of gastrointestinal disease. *Ann Allergy* 1985;55:694–702.
- [15] Koritz TN, Suzuki S, Coombs RRA. Antigenic stimulation with proteins of cow's milk via the oral route in guinea pigs and rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:72–5.
- [16] Kurisaki J, Nakamura S, Kaminogawa S, Yamauchi K, Watanabe S, Hotta K, et al. Antigenicity of modified β -lactoglobulin examined by three different assays. *Agric Biol Chem* 1985;49:1733–8.
- [17] Heyman M, Grasset E, Ducroc R, Desjeux JF. Antigen absorption by jejunal epithelium of children with cow's milk protein intolerance. *Pediatr Res* 1988;24:197–202.
- [18] Heyman M, Andrianisoa M, Crain-Denoyelle AM, Desjeux JF. Effect of oral or parenteral sensitisation to cow's milk on mucosal permeability in guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92:242–6.
- [19] Bloch KJ, Walker WA. Effect of locally induced intestinal anaphylaxis on the uptake of a bystander antigen. *J Allergy Clin Immunol* 1981;67:312–6.
- [20] Perdue MH, Chung M, Gall DG. Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat. *Gastroenterology* 1984;86:391–7.
- [21] Sjolander A, Magnusson KE. Effects of antigen challenge on intestinal permeability and morphology in rats immunized with gliadin or ovalbumin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;84:284–90.