



Article original

# Sensibilisation parentérale du lapin aux protéines du lait de vache : effets sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin

## The parenteral sensitization of rabbit to cow's milk protein: Effects on the electrophysiological parameters of the intestine

N. Ayad<sup>a,\*</sup>, B. Hellal<sup>a</sup>, M. Maatoug<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculté des sciences, université Dj.-Liabès, 14, rue H.-Zoubeir-Ibn-El-Aouem, Gambetta, 22000 Sidi Bel'Abbes, Algérie

<sup>b</sup> Faculté des sciences, université de Tiaret, 14000 Tiaret, Algérie

Reçu le 27 janvier 2007 ; accepté le 30 août 2007

### Résumé

**But.** – Étudier l'effet de deux protéines majeures du lait de vache (la  $\beta$ -lactoglobuline [ $\beta$ -LG] et l' $\alpha$ -lactalbumine [ $\alpha$ -LA]) sur les paramètres électrophysiologiques de l'épithélium intestinal de lapins sensibilisés à ces deux allergènes, directement incriminés dans l'allergie aux protéines du lait de vache non immunologique et leurs effets systémiques.

**Méthodes.** – L'interaction des protéines (marquées au  $^{14}\text{C}$ -formol), avec la muqueuse intestinale de lapins sensibilisés par voie parentérale à la  $\beta$ -LG et à l' $\alpha$ -LA et des témoins a été suivie in vitro sur des fragments d'iléons montés en chambre de Ussing. Les paramètres électrophysiologiques qui caractérisent le tissu à l'état basal, puis dans le temps et à des intervalles réguliers ont été mesurés après stimulation par les protéines déposées dans le compartiment muqueux.

**Résultats.** – L'interaction de la  $\beta$ -LG et de l' $\alpha$ -LA avec la muqueuse intestinale significativement plus élevée chez les animaux sensibilisés que chez les témoins, est associée à une augmentation significative du courant de court circuit et de la différence de potentiel alors que la conductance reste inchangée.

**Conclusion.** – Ces résultats suggèrent que chez les animaux immunisés, l'interaction de la protéine sensibilisante avec la muqueuse intestinale provoque des anomalies de transport hydroélectrolytique et constitue une approche intéressante pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'intolérance aux protéines du lait de vache chez l'enfant qui serait la conséquence d'une perméabilité accrue à ces protéines.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

**Objectives.** – Study of the effect of cow's milk protein ( $\beta$ -lactoglobulin [ $\beta$ -LG] and  $\alpha$ -lactalbumin [ $\alpha$ -LA]) on the electrophysiological parameters of the intestine rabbits sensitized to these allergens, directly incriminated in the non immunologic allergy to cow's milk proteins and their systemic effects.

**Methods.** – The interaction of the proteins (marked to the  $^{14}\text{C}$ -formol), with the mucous intestinal of parenterally sensitized and some control rabbits, was followed-up in vitro on fragments of ileums mounted in Ussing chamber. The electrophysiological parameters which characterize the tissue to the basal state then in the time, in regular intervals, were measured after stimulation by the proteins deposited in the mucous compartment.

**Results.** – The interaction of  $\beta$ -LG and  $\alpha$ -LA with the intestinal mucous, significantly more increased among the sensitized than some control rabbits, is associated to a significant increase of the short circuit current and the difference of potential while the conductivity remain unchanged.

**Conclusion.** – These results suggest that the interaction of the sensitizing protein with intestinal mucous caused anomalies of hydroelectrolytic transport at the immunized animals and establishes an interesting approach for the understanding of physiopathological mechanisms of the increased permeability at these proteins.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Lait de vache ;  $\alpha$ -Lactalbumine ;  $\beta$ -Lactoglobuline ; Allergie au lait de vache ; Sensibilisation ; Paramètres électrophysiologiques

**Keywords :** Cow's milk;  $\alpha$ -Lactalbumin;  $\beta$ -Lactoglobulin; Cow's milk allergy; Sensitization; Electrophysiological parameters

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [helayad\\_@yahoo.fr](mailto:helayad_@yahoo.fr) (N. Ayad).

## 1. Introduction

Les protéines de lait de vache constituent une source diététique principale pouvant induire des réactions d'hypersensibilité chez quelques sujets prédisposés [1–4].

L'allergie aux protéines du lait de vache non immunologique (APLV) est une maladie qui atteint fréquemment les jeunes enfants et semble en augmentation et 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 [5,6]. Elle se manifeste cliniquement par des symptômes digestifs et extradiigestifs [7] qui disparaissent peu après l'exclusion du lait de vache.

Sur le plan fondamental, l'APLV 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. Dans ce contexte, des études sur des modèles animaux sensibilisés à des protéines alimentaires ont montré que la barrière intestinale pouvait être également altérée. Ainsi des lapins sensibilisés présentent des titres en IgG anti- $\beta$ -lactoglobuline et anti- $\alpha$ -lactalbumine ainsi que des flux transépithéliaux significativement plus élevés que ceux des témoins [8].

Ce travail a été engagé afin d'approcher l'interaction in vitro, des protéines majeures du lait de vache avec la muqueuse intestinale de lapins sensibilisés par voie parentérale à ces deux allergènes incriminés dans l'APLV : la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -LG) et l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -LA), cela en précisant sur le plan fondamental, l'effet de ces protéines sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin, à savoir : le potentiel d'action (PD, mV), le courant de court circuit ( $I_{cc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) et la conductance du tissu ( $G$ , mmho/cm<sup>2</sup>).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Animaux et immunisation

Deux groupes de six lapins de race néozélandaise, pesant entre 2 et 3 kg, sont immunisés séparément contre la  $\beta$ -LG et l' $\alpha$ -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, France). Les animaux non sensibilisés, au nombre de six, ont servi comme 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 septième, vingtième et trentième jours après la première injection. Deux jours plus tard, le sérum est testé pour établir les titres sériques en anticorps IgG anti- $\beta$ -LG et anti- $\alpha$ -LA et stocké à  $-80^\circ C$  [9]. Les titres en anticorps IgG anti- $\beta$ -LG et IgG anti- $\alpha$ -LA des sérums de lapins immunisés, après dilution au 1:100, sont établis par la méthode Elisa [10].

### 2.2. Marquage des protéines du lait de vache

Le marquage des protéines ( $\beta$ -LG et  $\alpha$ -LA du lait de vache – Sigma, France) est effectué par alkylation réductive au formaldéhyde marqué au <sup>14</sup>Carbone (<sup>14</sup>C), selon la technique de Jentoft et Dearborn [11].

### 2.3. Étude des paramètres électrophysiologiques en chambre de Ussing

La mesure des paramètres électrophysiologiques du tissu permet d'approcher l'interaction des protéines avec la muqueuse intestinale de lapins témoins et immunisés. Ces paramètres sont mesurés simultanément en deux chambres de Ussing permettant de présenter de part et d'autre une surface de l'intestin exposée sur 0,10–0,13 cm<sup>2</sup>. Les deux faces du tissu (côté muqueux et côté séreux) déterminent un compartiment muqueux et un compartiment séreux. Ces deux compartiments sont chacun remplis avec 2 ml d'une solution de Ringer (pH 7,4) et dont la composition est la suivante (mM) : 140 Na<sup>+</sup>, 5,2 K<sup>+</sup>, 1,2 Ca<sup>2+</sup>, 1,2 Mg<sup>2+</sup>, 120 Cl<sup>-</sup>, 25 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2,4 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0,4 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le système est thermostaté à 37 °C et carbogéné avec un mélange gazeux (95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>).

L'animal maintenu à jeun depuis la veille au soir est anesthésié avec une dose de pentobarbital sodique à 6 %. Après laparotomie, deux fragments d'iléon sont étalés et montés à plat séparément entre les deux demi-chambres de Lucite (surface exposée : 0,10–0,13 cm<sup>2</sup>) de chacune des deux chambres de Ussing. Après stabilisation du système, la protéine marquée au <sup>14</sup>C est introduite dans le compartiment muqueux, à la concentration de 1 mg/ml de façon à obtenir une activité totale de  $3,5 \times 10^6$  cpm environ. Les flux sont effectués en circuit ouvert.

La différence de potentiel (PD, mV) transépithéliale spontanée développée par le tissu est mesurée à l'aide d'un couple d'électrodes au calomel reliés par des ponts d'agar (KCl, 3M).

La résistance du fluide (en absence du tissu) ainsi que la résistance du tissu monté en chambre de Ussing sont obtenues par application de la loi d'Ohm ( $U = RI$ ). L'inverse de cette résistance donne la conductance ( $G = 1/R$ , mmho/cm<sup>2</sup>) qui représente l'index de la perméabilité de l'intestin aux électrolytes.

Ces deux paramètres sont mesurés en envoyant régulièrement dans le temps, grâce à un système d'électrodes Ag–AgCl connectées à une force électromotrice variable, de courtes impulsions de courant (10  $\mu A$ ) permettant de faire varier le potentiel transmembranaire de quelques millivolts. La différence de potentiel (PD, mV) et la conductance ( $G$ , mmho/cm<sup>2</sup>) sont mesurées toutes les dix minutes. Le courant de court circuit ( $I_{cc}$ ,  $\mu A/cm^2$ ) est calculé par la loi d'Ohm.

### 2.4. Analyse statistique

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

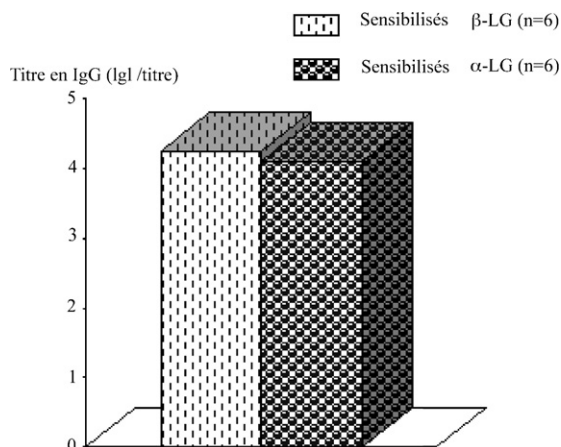


Fig. 1. Titres en IgG anti-β-LG et anti-α-LA, mesurés par la technique Elisa chez les lapins sensibilisés à la β-LG et α-LA.

### 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. Cela montre clairement que les animaux présentent un degré élevé de sensibilisation à ces deux protéines.

#### 3.2. Effets de la β-LG et de l'α-LA sur les paramètres électrophysiologiques

##### 3.2.1. Effet sur le courant de court circuit

L'addition de la β-LG sur le versant muqueux de tissu de lapin sensibilisé à cette protéine produit une stimulation nette de l'Icc par rapport aux tissus de lapins témoins. Cette stimulation persiste tout le long de l'expérimentation (Fig. 2).

Les mêmes effets sont observés avec l'α-LA ajoutée du côté muqueux, d'un tissu de lapin sensibilisé à cette protéine (Fig. 3).

Le Tableau 1 indique les moyennes ( $\pm$ SE) des paramètres électrophysiologiques :

Les valeurs moyennes de l'Icc, mesurées pour les tissus stimulés avec la β-LG des animaux sensibilisés à cette protéine sont significativement plus élevées ( $p < 0,001$ ) que celles observés chez les témoins. Les mêmes effets sont obtenus avec l'α-LA.

##### 3.2.2. Effet sur la PD et la conductance G

Il apparaît que les deux protéines augmentent significativement la PD transépithéliale des animaux sensibilisés à la β-LG ( $p < 0,01$ ) et à l'α-LA ( $p < 0,001$ ), respectivement.

Aucune différence significative n'est observée pour les valeurs de la conductance entre les tissus des animaux

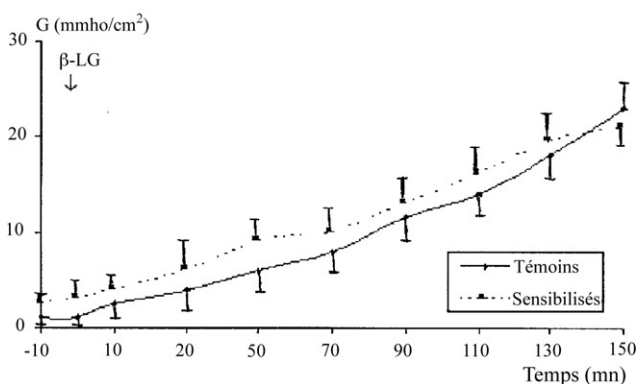
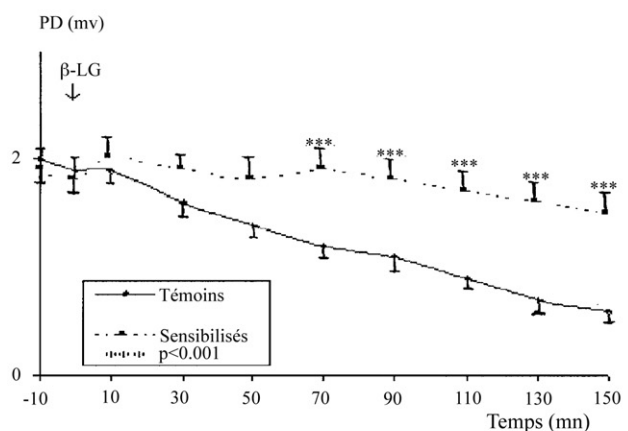
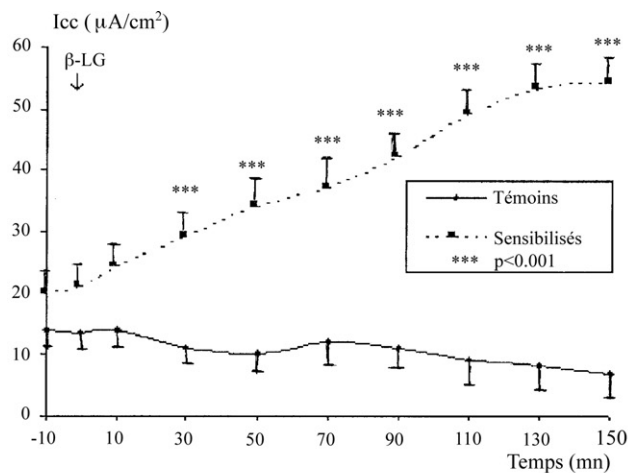


Fig. 2. Effet de la β-LG sur le courant de court circuit (Icc), la différence de potentiel (PD) et la conductance (G) des tissus de lapins sensibilisés à la β-LG ( $n = 11$ ) et des tissus de lapins témoins ( $n = 11$ ), montés en chambre de Ussing.

sensibilisés et ceux des tissus des animaux témoins (Figs. 2 et 3).

### 4. Discussion

Nos résultats indiquent que le dépôt de la β-LG et de l'α-LA du côté muqueux se traduit par une stimulation nette de l'Icc et de la PD, sur les tissus des animaux sensibilisés à ces deux protéines. En revanche, ces deux protéines restent sans effets sur ces paramètres, au niveau des tissus des animaux témoins. Cette augmentation de l'Icc persiste tout le long de

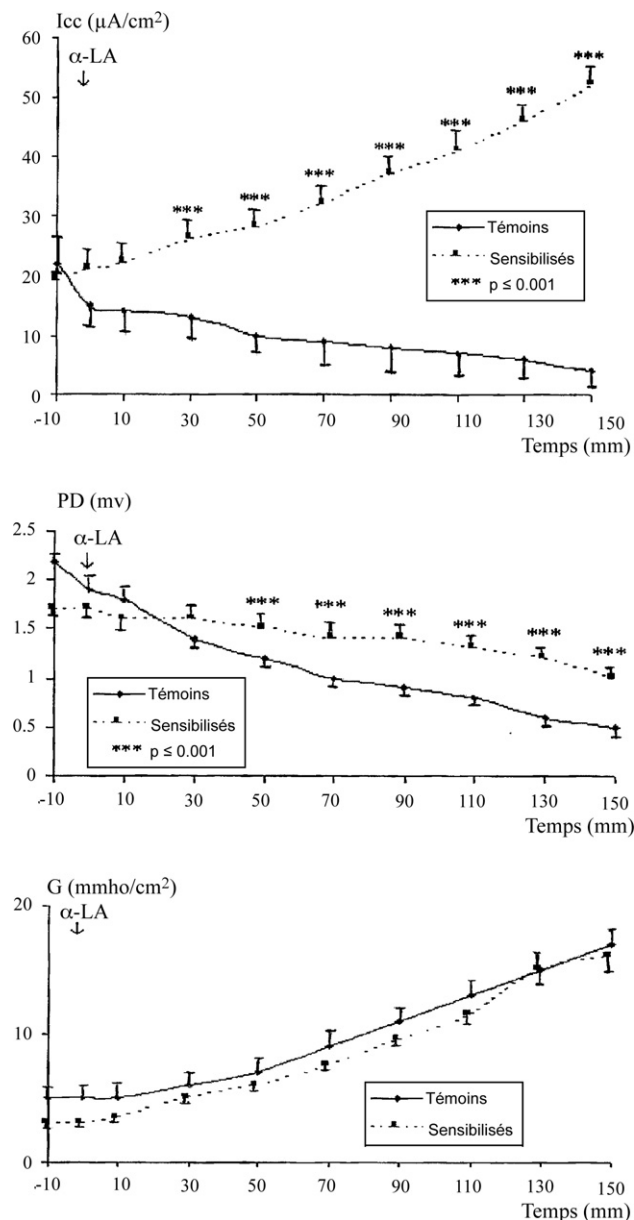


Fig. 3. Effet de l' $\alpha$ -LA sur le courant de court circuit ( $I_{cc}$ ), la différence de potentiel (PD) et la conductance ( $G$ ) des tissus de lapins sensibilisés à l' $\alpha$ -LA ( $n = 12$ ) et des tissus de lapins témoins ( $n = 11$ ), montés en chambre de Ussing.

Tableau 1  
Effets des protéines sur les paramètres électrophysiologiques

|              | $I_{cc}$ ( $\mu A/cm^2$ )       |                           | PD (mv)                        |                           | $G$ (mmho/cm $^2$ )    |                           |
|--------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
|              | T ( $n = 11$ )                  | $S_{\beta}$ ( $n = 11$ )  | T ( $n = 11$ )                 | $S_{\beta}$ ( $n = 11$ )  | T ( $n = 11$ )         | $S_{\beta}$ ( $n = 11$ )  |
| $\beta$ -LG  | 46,18 $\pm$ 5,50<br>$p < 0,001$ | 87,00 $\pm$ 5,00          | 1,47 $\pm$ 0,18<br>$p < 0,01$  | 2,40 $\pm$ 0,38           | 38,33 $\pm$ 3,80<br>NS | 39,00 $\pm$ 6,6           |
|              | $I_{cc}$ ( $\mu A/cm^2$ )       |                           | PD (mv)                        |                           | $G$ (mmho/cm $^2$ )    |                           |
|              | T ( $n = 11$ )                  | $S_{\alpha}$ ( $n = 12$ ) | T ( $n = 11$ )                 | $S_{\alpha}$ ( $n = 12$ ) | T ( $n = 11$ )         | $S_{\alpha}$ ( $n = 12$ ) |
| $\alpha$ -LA | 45,33 $\pm$ 5,6<br>$p < 0,001$  | 80,00 $\pm$ 3,70          | 1,56 $\pm$ 0,12<br>$p < 0,001$ | 2,13 $\pm$ 0,18           | 33,00 $\pm$ 2,2<br>NS  | 32,00 $\pm$ 2,00          |

Valeurs moyennes ( $\pm$ SE) entre le temps 0 et 150 minutes du courant de court circuit ( $I_{cc}$ ), de la différence de potentiel (PD) et de la conductance ( $G$ ).  
 $n$  : nombre de tissus étudiés simultanément en deux chambres de Ussing ; NS : non significatif ; T : témoins ;  $S_{\beta}$  : sensibilisés à la  $\beta$ -LG ;  $S_{\alpha}$  : sensibilisés à l' $\alpha$ -LA.

l'expérimentation. Cela concorde avec les résultats de Perdue et Gall [12], Curtis et al. [13] et Crowe et al. [14], sur des tissus de rats stimulés à l'ovalbumine et de Heyman et al. [15] sur des tissus de cobayes sensibilisés au lait de vache.

Nos résultats sont également à rapprocher de ceux observés sur un modèle d'anaphylaxie obtenue par infection expérimentale de rats par des nématodes du genre *Nippostrongylus brasiliensis* [16] et *Trichinella spiralis* [17,18]. Ces auteurs mettent en évidence une augmentation de l' $I_{cc}$  lorsque la muqueuse intestinale de ces animaux est stimulée par des antigènes extraits de ces nématodes.

Il apparaît donc que la  $\beta$ -LG et l' $\alpha$ -LA agissent sur les tissus des animaux sensibilisés par une augmentation de l' $I_{cc}$  et de la PD sans modification de  $G$ .

Cependant, on ne peut exclure un possible passage sous forme intacte de la  $\beta$ -LG et l' $\alpha$ -LA. L'augmentation du passage des macromolécules sous forme intacte a été dans tous les cas observée 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 [15].

Une fuite par la voie paracellulaire est très improbable du fait qu'aucune modification significative n'est observée pour  $G$  qui représente l'index de la perméabilité aux électrolytes par la voie paracellulaire aussi bien pour les tissus des animaux sensibilisés que pour ceux des témoins.

Dans des études de modèles d'animaux sensibilisés aux protéines alimentaires, il a été démontré que la stimulation de la muqueuse intestinale par des antigènes sensibilisants, se traduit par une anomalie de l'absorption de l'eau et des électrolytes [20].

Dans tous les cas, l'augmentation d' $I_{cc}$  se traduit par une augmentation de la sécrétion électrogénique de  $Na^+$  et  $Cl^-$  [12,16].

D'autres médiateurs peuvent être également libérés par l'activation des mastocytes, notamment la 5-hydroxytryptamine et les prostaglandines D2 et E2 [22]. Ces substances sont capables d'induire une sécrétion active de  $Cl^-$  au niveau de l'intestin sensibilisé par des antigènes alimentaires [23].

Par ailleurs, une composante nerveuse de ces mécanismes a été mise en évidence par Crowe et al. [14]. Ces derniers ont montré en effet que la substance P qui est un neurotransmetteur

peptidique augmentait significativement l'Icc au niveau des fragments d'intestin de rats sensibilisés à l'ovalbumine. En revanche, l'emploi de tétrotoxine (TTX) qui est un puissant inhibiteur des canaux de  $\text{Na}^+$  et donc de la conduction nerveuse, bloque ce processus.

Dans notre travail, il apparaît clairement que l'augmentation de l'absorption intestinale de la  $\beta$ -LG et de l' $\alpha$ -LA est associée à l'augmentation de l'Icc et de la PD au niveau des tissus des animaux sensibilisés. On peut donc penser que l'exposition de la muqueuse intestinale à ces protéines sensibilisantes se traduit par une activation des cellules immunocompétentes de la lamina propria qui déclenchent des réactions immunitaires locales responsables de l'augmentation des processus d'endocytose et des activités électrogéniques.

L'augmentation de l'Icc est probablement en relation avec une sécrétion active de chlore puisqu'il est clairement établi que l'histamine stimule la sécrétion de chlore et augmente l'Icc [24–26].

## 5. Conclusion

Cette étude, nous a permis d'évaluer l'effet positif de la sensibilisation parentérale aux deux protéines majeures du lait de vache : la  $\beta$ -LG et l' $\alpha$ -LA, sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin (iléon) de lapin qui montrent des titres en IgG anti- $\beta$ -LG et anti- $\alpha$ -LA plus élevés que chez les témoins.

L'étude in vitro des échanges transépithéliaux, réalisés en chambre de Ussing sur la muqueuse iléale de lapin sensibilisé à l'une de ces deux protéines, montre que le flux d'accumulation de ces protéines est corrélé positivement avec l'augmentation du courant de court circuit qui se traduit par une sécrétion électrogénique de chlore, sans modification de la conductance des tissus.

Ce modèle expérimental qui propose l'utilisation des protéines incriminées dans l'APLV constitue une approche intéressante pour la compréhension de la physiopathologie de cette anomalie chez l'enfant. En plus, nos résultats confirment bien certaines données de la littérature qui expliquent le phénomène de diarrhées chez l'enfant atteint d'APLV, conséquence d'une perméabilité accrue qui survient lorsque leur muqueuse intestinale est en contact avec les allergènes du lait de vache.

## Références

- [1] Bahna SL. Pathogenesis of milk hypersensitivity. *Immunol Today* 1985;6:153–4.
- [2] Changin G, Pattern R, Verkasalo J, Kuitinen P, Savilathi E. Cow's milk intolerance. *Acta paediatr Scand* 1981;10:31–5.
- [3] 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.

- [4] 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.
- [5] Caillard I, Tomé D. Transport des antigènes protéiques majeurs du lactosérum bovin dans l'épithélium intestinal. *Cah Nutr Diet* 1995; 5:306.
- [6] Heyman M, Desjeux JF. Rôle de l'épithélium digestif dans le transfert des protéines du lait. *Cah Nutr Diet* 1996;1:19.
- [7] 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.
- [8] Ayad N, Hellal B, Maatoug M. Sensibilisation parentérale du lapin aux protéines du lait de vache : effets sur la perméabilité intestinale. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006;46:696–700.
- [9] 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.
- [10] Engwall E, Pearlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay Elisa. *J Immunol* 1972;1:129–35.
- [11] Jentoft N, Dearborn DG. Labeling of protein by reductive methylation using sodium cyanoborohydride. *J Biol Chem* 1979;254:4359–65.
- [12] Perdue MH, Gall DG. Intestinal anaphylaxis in the rat jejunal response to in vitro antigen exposure. *Am J Physiol* 1986;250:427–31.
- [13] Curtis HG, Patrick MK, Catto-Smith AG, Grant-Call D. Intestinal anaphylaxis in the rat. Effect of chronic antigen exposure. *Gastroenterology* 1990;98:1558–66.
- [14] Crowe SE, Sestini P, Perdue HM. Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport response to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* 1990;99:74–82.
- [15] 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.
- [16] Perdue MH, Marshall J, Masson S. Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 1990;98:561–7.
- [17] Russel DA, Castro GA. Immunological regulation of colonic ion transport. *Am J Physiol* 1989;256:396–403.
- [18] Harari Y, Castro GA. Reconstitution of immunemediated ion secretion in gut mucosa of the athymic rat. *Parasite Immunol* 1991;31:313–28.
- [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.
- [22] Catto-Smith AG, Patrick MK, Hardin JA, Grant-Gall D. Intestinal anaphylaxis in the rat: Mediators responsible for the ion transport abnormalities. *Agents Actions* 1989;28:185–91.
- [23] Castro GA, Harari Y, Russell DA. Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. *Am J Physiol* 1987;253:540–8.
- [24] Linaker BD, McKay JS, Higgs NB, Turnberg LA. Mechanisms of histamine – stimulated secretion in rabbit ileal mucosa. *Gut* 1981;22: 964–70.
- [25] McCabe RD, Smith PL. Effects of histamine and histamine receptor antagonists on ion transport in rabbit descending colon. *Am J Physiol* 1984;247:411–8.
- [26] Wasserman SI, Barrett KE, Huott PA, Beuerlein G, Kagnoff MF, Dharmasathaphorn K. Immun – related intestinal C1 – secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. *Am J Physiol* 1988;254:53–62.