



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com

Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 48 (2008) 526–532

REVUE FRANÇAISE
D'ALLERGOLOGIE
ET D'IMMUNOLOGIE CLINIQUE

Article original

Modèles animaux d'allergie alimentaire. Application aux protéines de blé

Animal models of food allergy. Application to wheat proteins

M. Bodinier^{a,*}, M. Leroy^a, K. Adel-Patient^b

^a UR1268, biopolymères interactions et assemblages (BIA), équipe allergie aux protéines végétales, INRA, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes cedex 03, France

^b UR496 unité d'immunoallergie alimentaire, INRA, institut de biologie et de technologie de Saclay (iBiTeC-S), CEA de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

Reçu le 1^{er} septembre 2008 ; accepté le 12 septembre 2008

Disponible sur Internet le 4 novembre 2008

Résumé

Introduction. – Les allergènes responsables de l'allergie alimentaire à la farine de blé (AAFB) commencent à être bien caractérisés. Cependant, des modèles animaux produisant des IgE de spécificité fine et des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez les patients allergiques sont d'un grand intérêt pour l'étude précise des allergènes et des mécanismes impliqués dans l'AAFB. L'objectif de nos travaux est de développer, dans un premier temps, un modèle souris d'allergie à un extrait total de gliadines, puis de l'appliquer à deux allergènes majeurs du blé impliqués dans l'AAFB chez l'enfant et l'adulte, respectivement, la protéine de transfert de lipide (LTP) et les ω 5-gliadines.

Méthodes. – Dans un premier temps, nous avons déterminé la souche de souris et la dose d'allergène nécessaire pour induire une réaction allergique au blé optimale. Trois souches de souris (Balb/cJ, B10.A et C3H/HeJ) reçoivent quatre injections intrapéritonéales successives d'un extrait total de gliadines (10 ou 20 μ g) adsorbé sur de l'alum. Les niveaux de sensibilisation sont évalués par dosages des IgE et IgG1 spécifiques des gliadines et des cytokines sécrétées par les splénocytes réactivés ex-vivo par les gliadines. Des tests de dégranulation in vitro de basophiles (RBL) sont également effectués. L'intensité de la réaction allergique est, de plus, comparée in vivo, par l'analyse de la production de cytokines de type Th2 et l'influx cellulaire d'éosinophiles dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA) après un test de provocation intranasal par l'extrait gliadines. Des sensibilisations et des tests de provocation par la LTP ou les ω 5-gliadines sont ensuite réalisés.

Résultats. – La plus forte sensibilisation est observée chez la souris Balb/cJ, quel que soit la dose de gliadines considérée. Après le test de provocation, ces souris développent une réaction allergique intense comme le démontrent la forte production de cytokines de type Th2 et l'influx d'éosinophiles dans les LBA. À l'opposé, une réaction faible, voire nulle était observée chez les souris B10.A et C3H/HeJ. Tandis que les sensibilisations des souris Balb/c par les ω 5-gliadines se sont révélées peu efficaces, les administrations de LTP ont conduit à une production significative d'IgE et IgG1 spécifiques et une dégranulation spécifique de la lignée RBL, mais peu ou pas de sécrétion de cytokines de type Th2 par les splénocytes réactivés. L'induction de la réponse allergique après exposition intranasale à la LTP s'est révélée peu efficace, malgré un influx cellulaire dans les LBA.

Conclusion. – La souris Balb/cJ, sensibilisée par voie intrapéritonéale avec un extrait total de gliadines, semble reproduire une partie des marqueurs de l'AAFB, mais l'étude de la sensibilisation par les allergènes purifiée semble plus complexe.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The allergens responsible for wheat food allergy are beginning to be characterized. Nevertheless, animal models that produce highly-specific IgE and clinical symptoms comparable to those observed in allergic patients are of great interest for precise studies of allergens and of the mechanisms involved in wheat allergy. The aim of our research was to develop, in the first instance, a mouse model of allergy to a total extract of gliadins, then to use this model to study two major wheat allergens involved in wheat food allergy on children and adults, namely, the lipid-transfer protein (LTP) and the omega-5 gliadins.

Methods. – First, we determined the mouse strain and the allergen dose required to induce an optimal allergic reaction to wheat. Three strains of mice (Balb/cJ, B 10.A ND c3 h/HeJ) received four successive intraperitoneal injections of a total-gliadin extract (10 or 20 μ g) adsorbed on alum.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : bodinier@nantes.inra.fr (M. Bodinier).

The level of sensitization was determined by assay of gliadin-specific IgE and IgG1 and by the level of cytokines secreted by splenocytes activated *in vivo* by the gliadins; *in vitro* basophil (RBL) degranulation tests were also done. In addition, the intensity of the allergic reaction was evaluated *in vivo* by analysis of the production of type Th2 cytokines and the influx of eosinophils in bronchoalveolar fluid (BAF) after intranasal gliadin extract provocation. Sensitization assays and provocation tests with LTP and omega-5 gliadins were done subsequently.

Results. – The highest level of sensitization was observed in the Balb/cJ mice, whatever the dose of gliadins used. After the provocation test, these mice developed an intense-allergic reaction, as demonstrated by the strong production of type Th2 cytokines and the influx of eosinophils in the BAF. In contrast, a weak or no reaction was observed in the other two mouse strains. While sensitization of Balb/cJ mice by omega-5 gliadins was not very effective, administration of LTP induced significant production of specific IgE and IgG1 as well as specific degranulation of RBL cells, but little or no secretion of type Th2 cytokines by activated splenocytes. Induction of an allergic response after intranasal introduction of LTP was not very effective, in spite of the cellular influx in the BAF.

Conclusion. – Balb/cJ mice, sensitized by intraperitoneal injection of a total-gliadin extract, appeared to produce some of the markers of wheat allergy, but the results of the sensitization studies with the purified allergens appear to be more complex.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie au blé ; Balb/cJ ; Gliadines ; IgE ; LTP ; Modèle souris ; ω 5-gliadines

Keywords: Wheat allergy; Balb/cJ; IgE; Gliadins; Lipid-transfer protein; Mouse models; Omega-5 gliadins

1. Introduction

Le développement de modèles animaux, capables de produire des IgE ayant la même spécificité que les IgE humaines et développant des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez les patients allergiques, présente un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de l'allergie alimentaire. Du fait des connaissances accumulées sur la génétique et l'immunologie chez la souris, cette espèce animale a souvent été utilisée pour réaliser ce type d'études [1–5]. Par leurs caractéristiques, différentes souches de souris sont particulièrement utilisées en allergie, ainsi que différentes voies de sensibilisation expérimentales. On note, notamment, des sensibilisations par administration intragastrique combinée avec la toxine du choléra, mais également par injection intrapéritonéale combinée avec l'alum. La souris Balb/cJ est une souche forte productrice d'IgE, mimant ainsi le phénotype atopique humain, qui s'avère très intéressante pour étudier la phase de sensibilisation aux allergènes [6], mais également la phase de déclenchement de la réaction allergique [7]. Par ailleurs, la souris C3H/HeJ peut être efficacement sensibilisée à des allergènes du lait de vache et de l'arachide [8,9]. La souche B10.A est capable de produire des IgE spécifiques vis-à-vis des protéines de blé et présente des modifications anatomiques et physiologiques proches des réactions d'hypersensibilité au blé après effort retrouvées chez l'homme [3,10].

Les protéines de blé se divisent en deux classes, en fonction de leur solubilité : les albumines et globulines (AG), solubles dans l'eau et les tampons salins et incluant les protéines de transfert de lipide (LTP) et les inhibiteurs d' α -amylase et les gliadines et gluténines, aussi appelées les prolamines, qui sont insolubles dans ces solutions. Différents allergènes, impliqués dans l'allergie alimentaire à la farine de blé (AAFB), ont été identifiés, aussi bien dans les fractions AG que dans les fractions prolamines [11–13]. La fraction AG contient des allergènes majeurs chez les enfants atteints du syndrome de dermatite atopique associé à de l'eczéma (SDAE). Récemment, une de nos études a permis d'identifier des IgE spécifiques de la

LTP dans le sérum de patients allergiques aux protéines de blé [11]. Les gliadines contiennent également certains allergènes impliqués dans l'AAFB. Cette famille de protéines se divise en α , β , γ et ω gliadines, cette dernière fraction étant elle-même subdivisée en ω 1,2- et ω 5-gliadines. Les ω 5-gliadines sont des allergènes majeurs responsables d'anaphylaxie et/ou d'urticaire ou d'anaphylaxie induite par l'effort (AIE) [13–16], les α et β -gliadines sont fréquemment reconnues par les IgE des enfants atteints du SDAE et récemment, des IgE spécifiques des γ - et ω 2-gliadines ont été détectés dans le sérum des patients qui développaient des réactions d'hypersensibilité aux hydrolysats de protéines de blé [17].

Cette étude préliminaire a pour objectif de développer des modèles animaux de la sensibilisation allergique aux protéines de blé. Ces modèles pourraient avoir de nombreuses applications, tant au niveau fondamental qu'au niveau thérapeutique. D'un point de vue fondamental, ils nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes de la sensibilisation et de la réaction allergique et d'obtenir des informations sur les relations entre la structure d'une protéine et son allergénicité. D'un point de vue thérapeutique, ces modèles pourraient être utiles pour comparer l'allergénicité de différents types de blé ou de différentes matrices alimentaires. Nous avons utilisé, dans un premier temps, un extrait de gliadines et avons évalué l'influence de la dose de gliadines et de la souche de souris sur l'induction de la sensibilisation et de la réaction allergique. Nous avons, dans un second temps, réalisé des essais de sensibilisation à deux allergènes majeurs du blé chez l'enfant et l'adulte, respectivement, la LTP et les ω 5-gliadines.

2. Méthodes

2.1. Sensibilisation expérimentale et déclenchement de la réaction allergique par un extrait total de gliadines chez différentes souches de souris

Des souris Balb/cJ (centre d'élevage René-Janvier), C3H/HeJ ou B10.A (Harlan) femelles exemptes de pathogènes spécifiques sont hébergées en animalerie conventionnelle et

l'ensemble des expérimentations est réalisé selon la réglementation en vigueur. L'alimentation des souris est dépourvue de protéines végétales (aliment synthétique produit par l'unité de préparation des aliments expérimentaux, INRA, Jouy-en-Josas). Les souris reçoivent quatre injections intrapéritonéales d'un extrait total de gliadines adsorbé sur de l'alum, à dix jours d'intervalle. Deux doses d'extrait de gliadines sont testées (0, 10 ou 20 µg par souris ; 6 à 8 souris par lot). Les niveaux de sensibilisation sont évalués par dosages immunoenzymatiques des IgE et des IgG1 spécifiques des gliadines dans des sérums prélevés après la quatrième injection, et par dosage des cytokines Th1/Th2 sécrétées par les cellules spléniques réactivées ex-vivo par l'extrait de gliadines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN γ et TNF α ; technologie BioPlex et réactifs BioRad). La phase de déclenchement de la réaction allergique est étudiée in vitro, à l'aide des sérums des souris immunisées, en utilisant le test *rat basophilic leukemia* (RBL). Ce test consiste à analyser la capacité des IgE sériques spécifiques des gliadines à faire dégranuler la lignée RBL, cette dernière étant capable de reconnaître les IgE de souris et de les fixer via son récepteur de surface : le Fc ϵ RI. Après sensibilisation des cellules RBL par les sérums des différents lots de souris, la dégranulation est induite par incubation avec l'extrait de gliadines, puis dosages enzymatiques de la β -hexosaminidase, enzyme libérée parallèlement à l'histamine.

Par ailleurs, le déclenchement de la réaction allergique chez les différentes souches de souris est comparé in vivo, en dosant la production de cytokines de type Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN γ et TNF α) et l'influx d'éosinophiles dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA) collectés 24 heures après un test de provocation intranasal avec les gliadines totales [7].

2.2. Sensibilisation expérimentale et déclenchement de la réaction allergique par la LTP ou les ω 5-gliadines chez la souris Balb/cJ

Dans une seconde série d'expériences, des sensibilisations avec des allergènes majeurs de l'enfant et de l'adulte dans le contexte de l'AAFB, respectivement la LTP et les ω 5-gliadines, sont réalisées chez la souris Balb/cJ. Les sensibilisations sont réalisées par injection par voie intrapéritonéale avec les gliadines totales (10 µg), la LTP (2,5 et 10 µg) ou les ω 5-gliadines (2,5 et 10 µg) adsorbées sur de l'alum. Quatre injections sont réalisées à dix jours d'intervalle, puis les sérums sont collectés pour effectuer le dosage immunoenzymatique des IgE et des IgG1 spécifiques des différents allergènes, ainsi que les tests RBL. Les productions de cytokines par les cellules de la rate après réactivation avec l'allergène sensibilisant sont également comparées (IL-4, IL-5 et IFN γ – kit Biosource, Invitrogen, Mouse CytoSetTM).

Le déclenchement de la réaction allergique est réalisé par un test de provocation intranasal par l'allergène sensibilisant. Les marqueurs d'induction de la réaction allergique locale sont les productions de cytokines Th1 (IFN γ) et Th2 (IL-4, IL-5 – kit Biosource, Invitrogen, Mouse CytoSetTM) et l'influx cellulaire

d'éosinophiles dans les LBA collectés 24 heures après le test de provocation.

3. Résultats

3.1. Sensibilisation et déclenchement de la réaction allergique par un extrait total de gliadines chez différentes souches de souris

3.1.1. Comparaison des niveaux de sensibilisation chez les souris Balb/cJ, C3H/HeJ et B10.A

Quelle que soit la souche, aucun anticorps spécifique des gliadines n'est détectable chez les souris recevant 0 µg de gliadines. À l'inverse, une production significative d'IgE (Fig. 1A) et d'IgG1 (Fig. 1B) anti-gliadines est observée chez toutes les souches de souris testées. Pour les trois souches de souris, aucune différence significative ($p = 0,05$) entre les deux doses de gliadines, n'est observée. En revanche, quelle que soit la dose, la production d'IgE et d'IgG1 spécifique des gliadines est plus forte chez la souris de Balb/cJ par rapport aux deux autres souches ($p < 0,05$).

Ces résultats ont été confirmés par les profils de cytokines sécrétées par les splénocytes réactivés par les gliadines. Chez les souris Balb/cJ immunisées avec l'extrait de gliadines, nous avons observé une sécrétion élevée de cytokines de type Th2 et une sécrétion modérée de cytokines de type Th1. Des niveaux dix fois plus bas de cytokines de type Th2 ont été mesurés chez les souris C3H/HeJ et B10.A par rapport aux souris Balb/cJ (données non figurées).

3.1.2. Test de dégranulation RBL

Les sérums des souris Balb/cJ du groupe témoin négatif (0 µg) et du lot sensibilisé avec 10 µg de gliadines ont été utilisés dans un test de dégranulation in vitro sur cellules RBL (Fig. 2). Aucune dégranulation n'est observée avec le sérum témoin. À l'inverse, un fort pourcentage de dégranulation (27 %) de la lignée RBL est observé après sensibilisation avec le sérum des souris sensibilisées aux gliadines et après activation avec 1 µg/ml de gliadines totales. Ce résultat permettait de confirmer la production d'IgE spécifiques des gliadines totales fonctionnelles dans les sérums des souris Balb/cJ sensibilisées.

3.1.3. Déclenchement de la réaction allergique in vivo

Après un test de provocation intranasal, les cytokines de type Th2, marqueurs du déclenchement de la réaction allergique, notamment IL-4 et IL-5 (Fig. 3), sont intensément sécrétées dans le LBA des souris Balb/cJ sensibilisées par 10 ou 20 µg de l'extrait de gliadines, tandis que cette sécrétion n'est pas détectable chez les souris Balb/cJ témoins (0 µg). Parallèlement, peu ou pas de cytokine Th2 n'est détectée dans les LBA des souris B10.A ou C3H/HeJ (données non présentées). Après provocation, un influx d'éosinophiles significatif est observé chez les souris Balb/cJ, quelle que soit la dose de sensibilisation, tandis qu'aucun influx significatif d'éosinophiles n'est détecté dans les autres lots de souris (données non figurées).

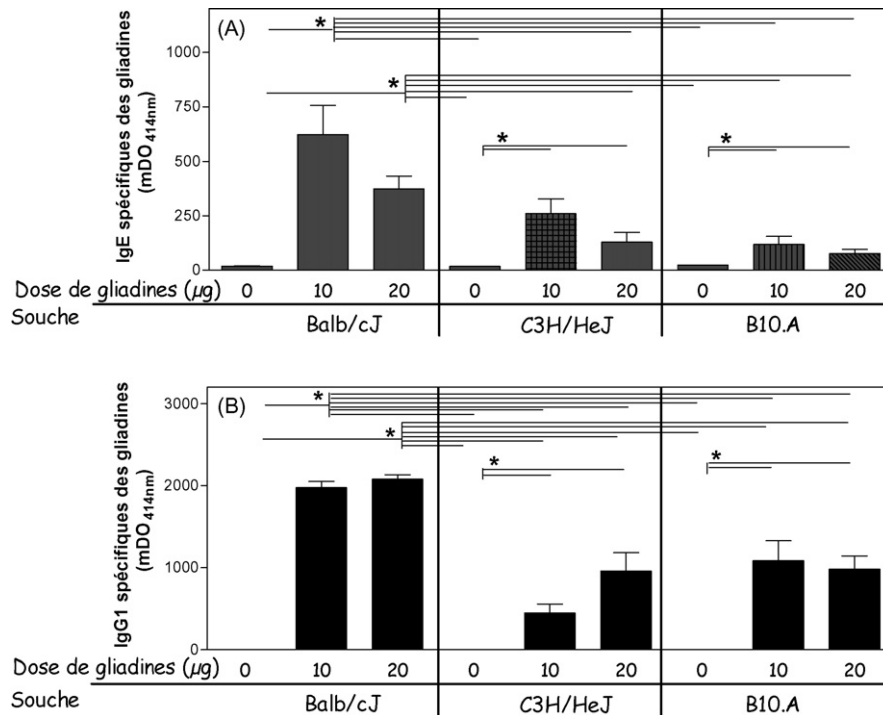


Fig. 1. IgE (A) et IgG1 (B) anti-gliadines produites par les trois souches de souris après quatre administrations intrapéritonéales de l'extrait de gliadines adsorbé sur l'alum. Des immunisations intrapéritonéales avec 10 ou 20 µg d'extrait gliadines adsorbé sur l'alum ont été effectuées les jours 0, 10, 20 et 30. Les souris témoins ont reçu l'alum avec du PBS (dose 0 µg). Les sérums ont été prélevés le jour 39 et les anticorps spécifiques de l'extrait gliadines ont été analysés par dosages immunoenzymatiques. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance à 414 nm et correspondent aux moyennes plus ou moins l'écart-type de six à huit souris par lot. * indique une différence significative entre les lots ($p < 0,05$ – obtenu par les tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney).

La souche de souris Balb/cJ était donc susceptible d'être sensibilisée à un extrait de gliadines totales. Cette sensibilisation se caractérise par une forte production d'IgE et d'IgG1 spécifiques et un profil de cytokines de type Th2. De plus, les souris Balb/cJ sensibilisées développent les signes du déclenchement de la réaction allergique après un test de provocation.

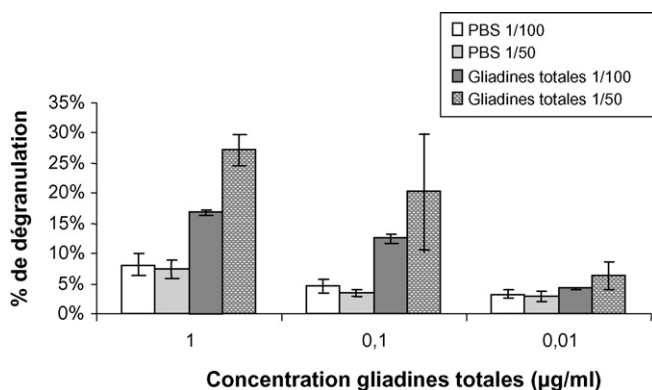


Fig. 2. Dégranulation des basophiles de rat (lignée RBL) après sensibilisation avec les sérums de souris, non sensibilisées ou sensibilisées avec 10 µg d'extrait gliadines et activation avec l'extrait total de gliadines. La lignée RBL est incubée pendant 24 heures avec les sérums des souris (dilutions au 1/50 ou au 1/100), puis activée pendant 50 minutes avec l'extrait gliadines à 1, 0,1 et 0,01 µg/ml pour induire la dégranulation et donc la libération de β -hexosaminidase. Celle-ci est dosée par réaction colorimétrique après incubation avec son substrat.

3.2. Sensibilisation de la souris Balb/cJ à deux allergènes majeurs du blé chez l'enfant et l'adulte, respectivement, la LTP et les ω 5-gliadines

Ces premiers résultats encourageants de sensibilisation par voie intrapéritonéale des souris Balb/cJ à un extrait de gliadines totales nous ont incités à réaliser des sensibilisations par voie intrapéritonéale avec de l'alum chez cette même souche de souris à l'aide des allergènes majeurs chez l'enfant et l'adulte dans le contexte de l'AAFB, respectivement, la LTP et les ω 5-gliadines. Nous avons pris, comme référence, un groupe de souris sensibilisé aux gliadines totales.

L'efficacité de la sensibilisation des souris Balb/cJ est évaluée en analysant la production d'IgE et d'IgG1 spécifiques des gliadines totales, des ω 5-gliadines ou de la LTP chez des souris recevant quatre injections intrapéritonéales de, respectivement, un extrait de gliadines (10 µg), les ω 5-gliadines (2,5 ou 10 µg) ou la LTP (2,5 ou 10 µg). Nous avons observé une production d'IgE (Fig. 4A) et d'IgG1 (Fig. 4B) spécifiques chez les souris sensibilisées aux gliadines totales (10 µg) et à la LTP (2,5 et 10 µg). La production d'anticorps spécifiques de la LTP semblait plus forte lors des sensibilisations à 10 µg de LTP par rapport à celles observées à 2,5 µg. Ces résultats ont été confirmés par le test RBL pour lequel, un pourcentage de dégranulation significatif est observé (12 %) avec les sérums des souris sensibilisées par 10 µg de LTP (Fig. 5). En revanche, à la dose de 2,5 µg de LTP, les sérums des souris sensibilisées n'induisaient pas d'activation significative de la lignée RBL.

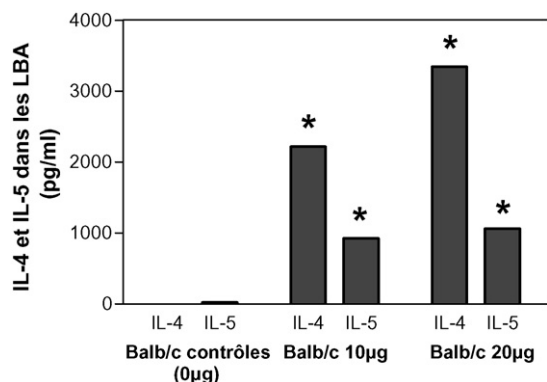


Fig. 3. Productions d'IL-4 et d'IL-5 dans les LBA collectés 24 heures après un test de provocation intranasal des souris Balb/cJ sensibilisées avec l'extrait de gliadines. Les souris ont été immunisées par quatre administrations intrapéritonéales successives de 10 ou 20 µg d'extrait gliadines adsorbé sur de l'alum. Les témoins négatifs correspondent aux souris ayant reçues des injections intrapéritonéales, d'alum et de PBS (0 µg). Les souris ont subi un test de provocation intranasal avec 10 µg d'extrait gliadines et le liquide des lavages bronchoalvéolaires (LBA) a été collecté 24 heures plus tard. Les cytokines produites dans les LBA sont dosées par la technologie et les réactifs BioPlex (BioRad). Les moyennes obtenues pour les six à huit souris Balb/cJ par groupe plus ou moins l'écart-type sont présentées. * indique une différence significative entre les lots ($p < 0,05$ – par analyse de variance et le test de Dunnett).

La réponse anticorps spécifique (Fig. 4A et B) contre les ω 5-gliadines était faible pour la sensibilisation par 2,5 µg de protéine, voire nulle pour celle à 10 µg. La faible production d'IgE spécifique de cet allergène a été confirmée par le test RBL : aucune dégranulation n'a été observée avec les sérums des souris sensibilisées par les ω 5-gliadines, et cela, quelle que soit la quantité utilisée (données non figurées).

La production de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-5) dans les surnageants des splénocytes réactivés par les gliadines, par les ω 5-gliadines ou par la LTP a été évaluée. Des productions

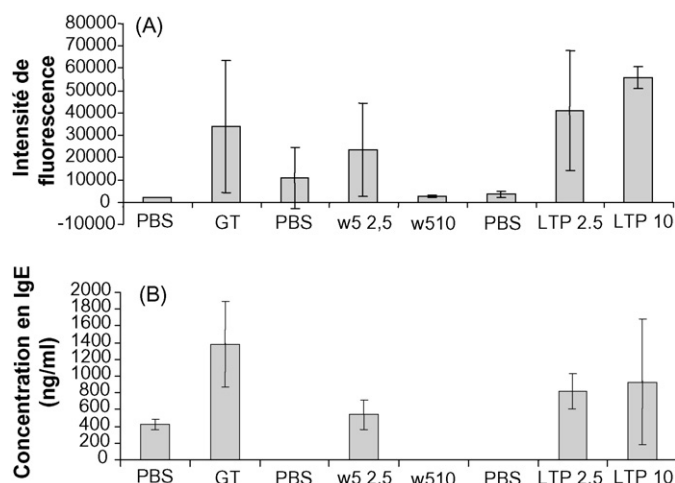


Fig. 4. Productions d'IgG1 (A) et d'IgE (B) spécifiques des gliadines totales, des ω 5-gliadines et de la LTP dans les différents groupes de souris Balb/cJ immunisées. Les souris (6 à 8 par groupe) sont immunisées par quatre injections intrapéritonéales successives d'alum avec du PBS (témoin négatif), des gliadines totales (GT, 10 µg), des ω 5-gliadines (w5 10 et w5 2,5 µg) ou de la LTP (10 et 2,5 µg). Les IgE et IgG1 sont dosées sur des plaques de microtitration revêtues de GT, d' ω 5-gliadines ou de LTP selon la fraction protéique sensibilisante.

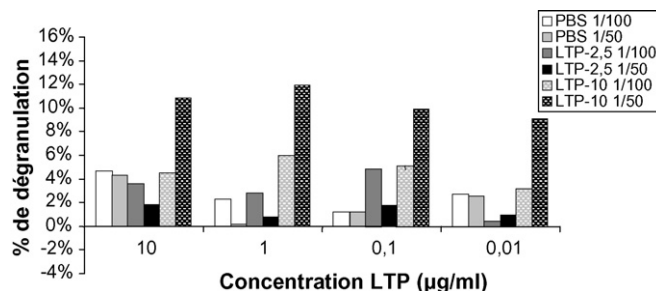


Fig. 5. Dégranulation de la lignée RBL après incubation avec les sérums de souris sensibilisées avec la LTP (2,5 et 10 µg). Après incubation avec les sérums des souris (dilués au 1/50 ou au 1/100), les cellules sont activées par la LTP (10, 1, 0,1 et 0,01 µg/ml), puis la dégranulation est évaluée par dosage de la β -hexosaminidase dans le surnageant de culture.

très faibles d'IL-4 et nulles d'IL-5 ont été mesurées chez les souris sensibilisées aux ω 5-gliadines et à la LTP (données non présentées).

Après test de provocation intranasal avec les différents allergènes, nous avons analysé l'influx de cellules (Fig. 6A) ainsi que la production d'IL-4 (Fig. 6B) dans les LBA. Nous avons observé une augmentation du nombre de cellules totales dans les LBA des souris sensibilisées aux gliadines totales et à la LTP, tandis qu'aucun changement n'est constaté pour les sensibilisations aux ω 5-gliadines. Seules les souris sensibilisées aux gliadines totales présentent une sécrétion d'IL-4 dans les LBA après le test de provocation à l'allergène sensibilisant.

En résumé, les souris sensibilisées aux gliadines totales sont capables de déclencher une réaction allergique complète et forte, celles sensibilisées à la LTP répondent avec une réaction intermédiaire (seulement un influx cellulaire) et aucune réponse significative n'a été constatée dans le groupe des souris sensibilisées aux ω 5-gliadines.

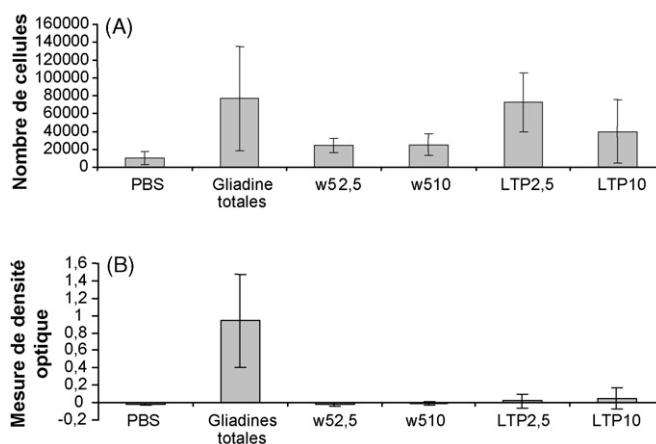


Fig. 6. Influx cellulaire total (A) et production d'IL-4 (B) dans les LBA après test de provocation intranasal avec les gliadines totales, les ω 5-gliadines ou la LTP. Après quatre immunisations par voie intrapéritonéale par 10 µg d'un extrait gliadines totales ou 10 ou 2,5 µg d' ω 5 gliadine ou de LTP, les souris subissent un test de provocation intranasal par l'allergène sensibilisant. L'influx cellulaire total (A) et la production d'IL-4 (B) dans les LBA sont évalués 24 heures après l'exposition. Aucune production d'IL-5 et d'IFN- γ n'a été observée dans les LBA des différents groupes de souris.

4. Discussion

Dans la première étude, nous avons développé un modèle de souris allergiques aux gliadines de blé, en examinant différentes doses de sensibilisation à un extrait de gliadines et en comparant trois souches de souris. Nous avons démontré des différences significatives d'intensité de sensibilisation entre les trois souches de souris. La souris Balb/cJ est caractérisée par une plus forte production d'IgE et IgG1 spécifiques de l'extrait par rapport aux deux autres souches, confirmée par le profil de cytokines de type Th2 observé dans les surnageants de culture des splénocytes réactivés par l'extrait de gliadines. L'induction de la réaction allergique est corrélée avec les niveaux de sensibilisation. En effet, les souris Balb/cJ sensibilisées montrent des niveaux de production de cytokines Th2 très intenses et un influx d'éosinophiles dans les LBA après le test de provocation intranasal par l'allergène sensibilisant. À l'opposé, et en accord avec les faibles niveaux de sensibilisation observés, les souris B10.A et C3H/HeJ ne développent pas de réaction allergique évidente après le test de provocation. La souris Balb/cJ apparaît donc être une souche appropriée pour étudier l'allergénicité des gliadines de blé, du moins dans les conditions expérimentales appliquées dans notre étude. Nos résultats diffèrent de l'étude de Kozai et al., qui ont avec succès sensibilisé des souris B10.A aux protéines de blé avec une production significative d'IgE et le développement de signes cliniques après challenge intragastrique et effort. Ils observaient chez les souris immunisées une réduction des performances à l'exercice et des dommages muqueux du petit intestin [3]. Dans notre étude, même si les souris B10.A développent des réponses IgE et IgG1 significatives, corrélées avec une production de cytokines de type Th2 par les splénocytes activés, la réaction allergique obtenue après le challenge intranasal reste faible. Des résultats contradictoires ont déjà été observés dans le contexte des allergies au lait de vache et à l'arachide chez les souris Balb/cJ. Alors que certaines équipes étaient capables d'obtenir une forte réponse allergique chez ces souris [1], d'autres n'ont pas réussi à obtenir de telles données [8]. En conclusion, ces données soulignent une nouvelle fois l'aspect multifactoriel de la réaction allergique, puisque outre le fond génétique, les facteurs environnementaux, les conditions d'hébergement, l'alimentation, voire l'expérimentateur semblent pouvoir influencer les niveaux de sensibilisation.

Dans la seconde étude, nous avons entrepris de sensibiliser la souche de souris Balb/cJ à deux allergènes majeurs du blé : les ω 5-gliadines et la LTP [14]. Contrairement aux résultats obtenus avec l'extrait de gliadines totales, et bien que les souris sensibilisées par l'extrait gliadines possèdent des IgE spécifiques des ω 5-gliadines, nous n'avons pas réussi à sensibiliser et à induire une réaction allergique des souris Balb/cJ avec les ω 5-gliadines purifiées. Différents épitopes linéaires et un motif consensus de type QXX1PX2QQ (X1 peut être un L, F, S ou un I et X2 un Q, E ou un G) de l' ω 5-gliadine ont été identifiés comme des structures immunodominantes chez les patients souffrant d'anaphylaxie induite par l'effort [11,16]. Dans notre

étude, nous utilisons comme adjuvant l'alum qui stimule préférentiellement les cellules Th2. L'adjuvant incomplet de Freund's (IFA) a également été utilisé pour sensibiliser et induire une réponse allergique chez la souris Balb/cJ [7]. La grande différence entre ces deux adjuvants est que l'IFA est capable de modifier, dénaturer la structure de l'allergène, permettant ainsi la production d'IgE dirigées contre des épitopes linéaires, alors que l'alum conserve la conformation structurale de la protéine permettant ainsi la production d'IgE contre des épitopes conformationnels [7]. Il serait donc intéressant de tester de nouvelles sensibilisations avec l'extrait de gliadines ou les ω 5-gliadines purifiées en présence d'IFA, afin d'évaluer les niveaux de sensibilisations dans ces conditions et, éventuellement, d'analyser les épitopes reconnus par les IgE des souris sensibilisées. En ce qui concerne les sensibilisations par la LTP, nous avons obtenu des résultats satisfaisants pour les injections intrapéritonéales avec de l'alum et la dose de 10 μ g de protéines. En effet, nous avons observé une production d'IgE et d'IgG1 spécifiques, une dégranulation de la lignée RBL, mais, cependant, pas ou peu de sécrétion de cytokines de type Th2 par les splénocytes activés. L'induction de la réponse allergique après exposition intranasale à la LTP s'est révélée peu efficace, malgré une augmentation de l'influx cellulaire total dans les LBA. Contrairement à l' ω 5-gliadine, aucun épitope linéaire n'a pu être mis en évidence sur la LTP, alors qu'il s'agit d'un allergène important chez les enfants souffrant de dermatite atopique associé à de l'eczéma. Cela suggère donc l'implication d'épitopes conformationnels chez le patient allergique. Dans notre étude, nous avons utilisé l'alum comme adjuvant, conservant ainsi la structure de la protéine. Il est donc souhaitable de conserver l'alum pour immuniser les souris avec la LTP. Les épitopes de ces deux allergènes majeurs, reconnus par les IgE humaines, sont donc de nature différente. Pour la réussite du modèle animal d'allergie alimentaire, il est donc important d'adapter l'adjuvant en fonction du type d'épitopes impliqués dans la pathologie.

5. Conclusions et perspectives

En conclusion, la souris Balb/cJ, sensibilisée par voie intrapéritonéale en présence d'alum, semble constituer un bon modèle pour obtenir des souris allergiques à un extrait de gliadines totales et, plus modérément, à la LTP. Il serait souhaitable d'envisager, à terme, une sensibilisation plus naturelle des souris Balb/cJ par voie intragastrique, en employant la toxine de choléra comme adjuvant [1,8,18]. Nous pourrions ainsi comparer les deux voies de sensibilisation (intrapéritonéale et intragastrique) en terme d'intensité de sensibilisation et d'induction de la réponse allergique, mais également en terme de spécificité de la réponse IgE aux niveaux protéique et épitope.

Références

- [1] Adel-Patient KBH, Ah-Leung S, Créminon C, Wal JM. Peanut- and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 2005;60:658–64.

- [2] Dearman RJ, Stone S, Caddick HT, Basketter DA, Kimber I. Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose–response analyses. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1586–94.
- [3] Kozai H, Yano H, Matsuda T, Kato Y. Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis in mice is caused by gliadin and glutenin treatments. *Immunol Lett* 2006;102:83–90.
- [4] Li XMK G, Huang CK, Lee SY, Schofield B, Soter NA, Sampson HA. Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:693–702.
- [5] Mine Y, Yang M. Epitope characterization of ovalbumin in balb/c mice using different entry routes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1774:200–12.
- [6] Dearman RJK I. Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicol Lett* 2001;120:181–6.
- [7] Adel-Patient KN MA, Proust B, e Silva JRL, Créminon C, Wal JM, Vargaftig BB. Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy* 2003;33:376–85.
- [8] Li XMS D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:150–8.
- [9] Morafo VSK, Huang Chih-Kang, Kleiner G, Lee Soo-Young, Sampson HA, Li, AndXiu-Min. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Th2–Th1 responses in C3H/HeJ and Balb/c mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1122–8.
- [10] Yano H, Kato Y, Matsuda T. Acute exercise induces gastrointestinal leakage of allergen in lysozyme-sensitized mice. *Eur J Appl Physiol* 2002;87:358–64.
- [11] Battais FMT, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y, Bodinier M, et al. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005;60:815–21.
- [12] Battais FPF, Popineau Y, Aparicio C, Kanny G, Guerin L, Moneret-Vautrin DA, et al. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy* 2003;33:962–70.
- [13] Mittag D, Niggemann B, Sander I, Reese I, Fiedler EM, Worm M, et al. Immunoglobulin E-reactivity of wheat-allergic subjects (baker's asthma, food allergy, wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis) to wheat protein fractions with different solubility and digestibility. *Mol Nutr Food Res* 2004;48:380–9.
- [14] Battais FCP, Popineau Y, Kanny G, Moneret-Vautrin A, Denery-Papini S. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *J Cereal Sci* 2005;42:109–17.
- [15] Lehto M, Palosuo K, Varjonen E, Majuri ML, Andersson U, Reunala T, et al. Humoral and cellular responses to gliadin in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2003;33:90–5.
- [16] Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, et al. Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 2004;279:12135–40.
- [17] Lauriere M, Pecquet C, Boulenc E, Bouchez-Mahiout I, Snegaroff J, Choudat D, et al. Genetic differences in omega-gliadins involved in two different immediate food hypersensitivities to wheat. *Allergy* 2007;62: 890–6.
- [18] Li XMS BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:206–14.