

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem-
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

Thèse de doctorat 3^{ème} cycle LMD

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : nutrition et Pathologies

Présentée par

KEDDAR Kawtar

Thème

**Rôle des probiotiques dans la
diminution et/ou la protection contre
les allergies alimentaires.**

SOUTENUE LE.....

Devant le Jury

Présidente	M ^{me} Kheira HAMMADI	Professeur	U. Mostaganem
Directrice	M ^{me} Hasnia ZIAR	Professeur	U. Mostaganem
Examineur	Mr Bouziane ABOUNI	Professeur	U. Sidi Belabbes
Examinatrice	M ^{me} Amina MELIANI	Professeur	U. Mascara
Examineur	Mr Abdelmalek CHAALEL	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire : 2023-2024

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

A mes parents

Je vous remercie du fond du cœur pour tout le soutien, tout l'amour, tous les conseils et toute la patience dont vous avez fait preuve durant mes études. Vous m'avez donné la force de faire ce que je voulais de ma vie, et pour tout cela, je vous en serais éternellement reconnaissante.

Veillez-trouver, dans ce modeste travail, le fruit de vos sacrifices ainsi que l'expression de ma profonde affection et ma vive reconnaissance que Dieu vous protège et vous garde.

A mon frère Mohamed Redouane et mes sœurs Meriem El Batoul et Ferdouas

Avoir des frères c'est un cadeau pour le cœur ! Merci pour votre amour, votre soutien infailible, merci de m'aimer et d'être toujours présents quand j'en ai besoin.

Je vous aime.

A mon Fiancé, Mohammed

Merci pour tout l'encouragement, le respect, l'amour et le soutien moral.

Merci infiniment pour l'accompagnement que tu m'as offert.

Merci à tous ceux qui m'aiment de près et de loin.

Kawtar KEDDAR

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de thèse dont le thème est « Rôle des probiotiques dans la diminution et/ou la protection contre les allergies alimentaires ».

Les travaux de recherche ont été réalisés au sein du Laboratoire des Micro-organismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem.

Je tiens dans un premier temps à remercier ma directrice de thèse le Pr. Hasnia ZIAR. Vous m'aviez fait un grand honneur en acceptant de me confier ce travail. Je vous remercie de votre patience, votre disponibilité, vos encouragements et de vos précieux conseils dans la réalisation de cette thèse. Votre compétence, votre dynamisme et votre rigueur ont suscité une grande admiration et un profond respect. Vos qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple. Veuillez croire à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car outre votre appui scientifique, vous étiez toujours là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Kheira HAMMADI de l'université de Mostaganem pour avoir accepté de présider le jury. Je suis honorée par sa présence

Je remercie également les professeurs Mr. Bouziane ABOUNI de l'université de Sidi Belabbes et Mme Amina MELIANI de l'université de Mascara, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en étant les examinateurs dans la commission d'examen de cette thèse.

Au Dr. Abdelmalek CHAALEL, Maître de conférences A à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail ainsi toutes nos discussions et ses conseils qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus.

Je voudrais aussi remercier tous les techniciens et ingénieurs dans les différents laboratoires de recherches aux sites INES et ITA qui ont toujours répondu présents.

La réalisation de ce travail a bénéficié du soutien inestimable de plusieurs personnes. Que toutes ces personnes trouvent ici l'expression de ma plus grande reconnaissance.

Résumé

Dans cette étude, nous avons cherché à évaluer l'effet anti-allergisant des bactéries probiotiques d'origine lait humain si administrées en âge précoce. La souche SL42 a été comparée à la bactérie probiotique de référence *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. Premièrement, l'isolat SL42 a été identifié génétiquement par analyse 16S rRNA et puis étudié *in vitro* afin de s'assurer qu'il remplit les principaux critères du statut probiotique (résistance au pH acide et aux sels biliaires, assimilation du cholestérol, activités antimicrobienne et anti-oxydante, susceptibilité aux antibiotiques). Des ratte Wistar en âge juvénile (3 semaines, n=8 dans chaque groupe) ont été ensuite sensibilisées séparément et sans adjuvant avec deux protéines animales (l'ovalbumine « OVA » ou la caséine concentrée bovine « CAS ») et recevant (gavage, 1/2 jours) ou non une des deux bactéries. Le schéma de sensibilisation a été suivi pendant 59 et 50 jours, respectivement dans les groupes recevant par pénétration intra-gastrique CAS et OVA. Les ratte recevant le PBS constituaient les groupes témoins. Le poids et la température corporel, l'incidence des diarrhées et leur score, les taux d'acide urique, d'éosinophiles, d'IgE spécifiques, d'histamine, de S100A8/A9 et de cytokines inflammatoires, ont été tous mesurés. Au terme des deux études, les contenus des microbiotes intestinaux ont été analysés et les animaux sensibilisés ont été sacrifiés. Des coupes histologiques ont été préparées par la suite. Les poids des rates ou des thymus ont été déterminés. La translocation bactérienne a été vérifiées dans les rates et les tissus mésentériques. Nos résultats indiquent que l'isolat SL42 est une *Lacticaseibacillus rhamnosus* et a reflété un statut probiotique-like très intéressant comparée à DSM 17938. Par ailleurs, les deux bactéries ont atténué les réponses allergiques systémiques à la caséine et à l'ovalbumine en réduisant les taux d'histamine, les niveaux d'IgE spécifiques, le nombre d'éosinophiles, le taux de S100A8/9 sériques et les concentrations de cytokines inflammatoires. L'analyse du jéjunum a confirmé l'effet protecteur des bactéries probiotiques dans les groupes recevant l'une ou l'autre des protéines allergisantes. Les bactéries lactiques et les espèces de *Clostridium* ont également augmenté dans les groupes traités aux probiotiques. Ces résultats suggèrent que les probiotiques originaire du lait humain pourraient être utilisés efficacement pour atténuer les allergies d'origine alimentaire. Des études plus approfondies sur le mécanisme moléculaire impliqué dans cette protection, sont fortement souhaitées.

Mots clefs : Allergie alimentaire, probiotique, lait humain, protéine allergisante, inflammation, protection.

Abstract

In this study, we aimed to evaluate the anti-allergic effect of probiotic bacteria of human milk origin when administered at an early age. The SL42 strain was compared to the reference probiotic bacterium *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. First, the SL42 isolate was genetically identified by 16S rRNA analysis and then studied *in vitro* to ensure that it meets the main criteria of probiotic status (resistance to acid pH and bile salts, cholesterol assimilation, antimicrobial and antioxidant activities, susceptibility to antibiotics). Juvenile Wistar rats (3 weeks, n=8 in each group) were then sensitized separately and without using an adjuvant with two animal proteins (ovalbumin “OVA” or bovine casein concentrate “CAS”) and receiving (gavage, every other day) or not either of the two bacteria. The sensitization schemes were followed for 59 and 50 days, respectively in the CAS and OVA intra-gastric sensitized groups. Rats receiving Phosphate Buffer Saline solution were taken as the control groups. Body weight and temperature, incidence and score of diarrhoea, sera levels of uric acid, eosinophils, specific IgE, histamine, S100A8/A9 and inflammatory cytokines were all measured. At the end of both studies, intestinal microbiote content was analyzed, and sensitized animals were sacrificed. Histological sections were subsequently prepared. The weights of the spleen or thymus were determined. Bacterial translocation was verified in spleen and mesenteric tissues. Our results indicate that the SL42 isolate is a *Lacticaseibacillus rhamnosus* and reflected a very interesting probiotic-like status compared to DSM 17938. In addition, both bacteria mitigated systemic allergic responses to casein and ovalbumin by reducing histamine, specific IgE, eosinophil count, serum S100A8/9 and inflammatory cytokine levels. The analysis of the jejunum confirmed the protective effect of probiotic bacteria in the groups receiving either of the allergenic proteins. Lactic acid bacteria and *Clostridium* species also increased in probiotic-treated groups. These results suggest that probiotics from human milk could be used effectively to alleviate food allergies. Further studies of the molecular mechanism involved behind this protection are highly desirable.

Keywords: Food allergy, probiotic, human milk, allergenic protein, inflammation, protection.

ملخص

حليب الام يحتوي على عدة عناصر فعالة ومفيدة للإنسان خاصة عندما تعطى في السن المبكر للطفل, من بين هذه العناصر كائنات دقيقة نافعة "probiotique" تهدف هذه الدراسة الى تأكيد احد المنافع للكائنات الدقيقة المستخرجة من حليب الام وهي الحماية من الحساسية المفرطة ضد التغذية او التقليل من الاعراض الناجمة عن ذلك.

في البداية تم استخراج سلالة " SL42 " من حليب ام حديثة الولادة وتتمتع بصحة جيدة و تحديد النمط الوراثي لها من خلال تحليل ARNr 16S , بالإضافة الى اجراء عدة دراسات للتأكد انها تنتمي الي الكائنات الدقيقة النافعة " Probiotique " من بينها : مقاومة وسط حامضي, مقاومة الصفراوية, مقاومة المكروبات الممرضة, مقاومة الانتيبيوتيك, قدرة على تفكيك الكليستروول.

ثانيا تقديم هذه السلالة "SL42" للجرذان من فصيلة "WISTAR" مقارنة مع سلالة مرجعية *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938 في ماء فيزيولوجي بتركيز 10^8 وحدة خلية. لقد قمنا باستعمال بروتينين مختلفين لاحداث حساسية التغذية: ألبومين بياض البيض "OVA" و الكازيين حليب البقر "CAS" , كانت مدة التجربة 50 يوما للحساسية ضد الالبومين و 59 يوما ضد الكازيين بشكل منفصل. تم خلال الدراسة قياس وزن الجسم ودرجة حرارته, و حدوث الإسهال ودرجته, ومستويات حمض البوليك في الأمصال, والحمضات, والغلوبيولين المناعي E النوعي, والهستامين, وS100A8/A9, والسيتوكينات الالتهابية. في نهاية كلتا الدراستين, تم تحليل محتوى الميكروبيوت المعوي, وتم التضحية بالحيوانات الحساسة, إعداد المقاطع النسيجية , تم تحديد أوزان الطحال أو الغدة الصعترية, و التحقق من الإزاحة البكتيرية في أنسجة الطحال والمساريقي.

تشير نتائجنا إلى أن عزلة SL42 هي *Lactactaseibacillus rhamnosus* وتعكس حالة شبيهة بالبروبيوتيك مثيرة جدًا للاهتمام مقارنةً بـ DSM 17938. بالإضافة إلى ذلك، خففت كلا البكتيريا من استجابات الحساسية الجهازية تجاه الكازين والألبومين البيضوي عن طريق تقليل الهستامين، و IgE المحدد، وعدد الحمضات، والمصل S100A8. /9. أكدت تحليل الصائم التأثير الوقائي لبكتيريا البروبيوتيك في المجموعات التي تتلقى أيًا من البروتينات المسببة للحساسية. كما زادت بكتيريا حمض اللاكتيك وأنواع كلوستريديوم في المجموعات المعالجة بالبروبيوتيك. تشير هذه النتائج إلى أنه يمكن استخدام البروبيوتيك الموجود في الحليب البشري بشكل فعال للتخفيف من الحساسية الغذائية. من المرغوب فيه للغاية إجراء المزيد من الدراسات حول الآلية الجزيئية التي تكمن وراء هذه الحماية.

الكلمات الرئيسية: حساسية الأغذية، البروبيوتيك، الحليب البشري، البروتين، الالتهاب، الحماية.

Liste des abréviations

DSM 17938 : *Lactobacillus reuteri* Protectis

SL42 : *Lactobacillus rhamnosus*

CAS : caséine de lait de vache

OVA : Ovalbumine de l'œuf.

i.g : voie intra-gastrique.

MRS : Man, Rogosa, Sharpe. Milieu utilisée pour la culture des *Lactobacillus*.

MH : Mueller-Hinton. Un milieu standardisé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

16S rRNA : ARN ribosomique constituant la petite sous-unité des ribosomes.

IFN- γ : Interferon.

PBS: Tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline).

UFC : Unité formant coloni

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : La prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) en Algérie ville de Constantine 2015 (Boughellout et al., 2015)	7
<u>Tableau 2</u> : Revue des facteurs de risque avérés et potentiels de la sensibilisation allergénique (Garcia-Larsen et al., 2016).....	10
<u>Tableau 3</u> : Score de gravité de l'allergie alimentaire (Nonnotte, 2016).....	14
<u>Tableau 4</u> : Les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfants et l'adulte (Moneret- Vautrin, 2008).....	12
<u>Tableau 5</u> : Principales familles et super familles d'allergènes d'origines végétales (Sampson et al., 2014)	13
<u>Tableau 6</u> : Principales familles d'allergènes d'origine animale (Jenkins et al., 2007 ; Sampson et al., 2014)..	14
<u>Tableau 7</u> : Classification des allergies alimentaires (Eigenmann et al.,2000 ; Silverberg et al., 2013 ; Hruz, 2014).....	18
<u>Tableau 8</u> : Bactéries productrices et fonctionnalités des principaux AGCC (Venegas et al., 2019).	34
<u>Tableau 9</u> : Les souches pathogènes utilisées.....	45
<u>Tableau 10</u> : Caractéristiques probiotiques de la souche SL42 comparées à L. reuteri DSM 17938.....	53
<u>Tableau 11</u> : Activité antimicrobienne des bactéries probiotiques	53
<u>Tableau 12</u> : Sensibilité aux antibiotiques des bactéries probiotiques.....	54
<u>Tableau 13</u> : Variation de la température corporelle (°C) pendant le challenge CAS.....	55
<u>Tableau 14</u> : Translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques chez les rattes soumises à un test de provocation à la caséine.....	65
<u>Tableau 15</u> : Mise en évidence de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques chez les rattes soumises à un test de provocation à l'ovalbumine	86

Liste des figures

Figure 1 : Type d'allaitement reçu par les enfants allergiques et sains (Boughellout et al., 2015).....	7
Figure 2 : Distribution géo-spatiale de la prévalence des symptômes actuels de l'allergie en fonction de l'altitude et l'âge (13-14 ans). Chaque symbole représente un centre. Les quatre symboles représentent différents niveaux de prévalence des symptômes combinés à leur catégorisation en tant que basse ou haute altitude. Les étoiles rouges indiquent une prévalence élevée des symptômes actuels de l'allergie ($\geq 10\%$) et une altitude élevée ($\geq 300\text{m}$) ; les diamants jaunes indiquent une prévalence élevée des symptômes actuels de l'allergie et une faible altitude; les cercles verts indiquent une faible prévalence des symptômes actuels de l'allergie et une altitude élevée ; et les carrés bleus indiquent une faible prévalence des symptômes actuels de l'allergie et une faible altitude (Mallol et al., 2012)	8
Figure 3 : L'arbre décisionnel pour le diagnostic d'une allergie alimentaire (Kose, 2019).....	16
Figure 4 : Modèles d'interaction de l'IgE avec les deux récepteurs, FcR et CD23. A) Les IgE libres peuvent se lier au FcRI sur les mastocytes (M) et après l'agrégation avec l'antigène induire une réaction inflammatoire conduisant à la libération des médiateurs. B) Les complexes IgE-antigène se fixent préférentiellement sur le CD23 présent à la surface des lymphocytes B. Le transfert des complexes IgE-antigène aux cellules dendritiques (CD) induit la présentation de l'antigène et la prolifération des lymphocytes T (Stolk et al., 2020)	20
Figure 5 : Régulation réciproque des cellules Treg et Th17 (Zhang et al., 2016).....	22
Figure 6 : Cellules lymphoïdes innées (Zhang et al., 2016).....	23
Figure 7 : Tolérance immunitaire aux antigènes oraux dans l'intestin (Yu et al., 2016).....	25
Figure 8 : Classification des effets indésirables des aliments (Baker et Sampson, 2018). Entérocolite induite par les protéines alimentaires (EIPA) ; Allergies induites par les protéines protéolysées (AIPP).....	28
Figure 9 : Distribution moyenne des genres Lactobacillaceae, par rapport à l'abondance totale des Lactobacillacées, dans les échantillons de 30 jours de fermentations de jus de carotte (à gauche), dans les prélèvements de kéfir (au milieu), et dans les sécrétions du vagin humain (à droite) (Qiao et al., 2022).....	31
Figure 10 : Mécanisme d'action des probiotiques dans le renforcement de la barrière épithéliale (Madsen, 2012)	32
Figure 11 : Voies métaboliques principales du microbiote bactérien impliquées dans la génération des AGCC (Frampton et al., 2020).....	34
Figure 12 : Transfert foeto-maternel de facteurs immunitaires et autres molécules actives (Jennewein et al.,	

2017) 40

Figure 13 : Composition du lait humain..... 41

Figure 14 : Schéma expérimental et groupes de rats examinés dans le cadre de la présente étude. La caséine bovine (Protifar©) a été utilisée comme allergène et administrée par voie intra- gastrique sans adjuvant à des rats. 48 rats femelles (âgés de 3 semaines) ont été répartis en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 1938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 19738 (groupe CAS-+DSM 19738). Dans tous les groupes de rats traités aux bactéries, le SL42 ou le DSM 17938 ont été administrés par gavage 1/2 jour du jour-3 au jour 58 48

Figure 15 : Arbre phylogénétique construit montrant la position du SL42 isolé avec les espèces de Lactobacillus apparentées 51

Figure 16 : Variation du poids corporel (g) avant le 1ier jour et après 58 jours de challenge CAS. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Aucune différence significative n'a été observée à $P > 0,05$. Groupe non sensibilisé (groupe témoin), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938)..... 55

Figure 17 : Taux d'acide urique sérique (mg/L) enregistrés le 1ier jour et après 58ème jour de provocation par la CAS. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). * Des différences significatives ont été observées à $P < 0,05$ 56

Figure 18 : Les niveaux d'IgE CAS (a) et d'histamine (b) dans le sérum ont été évalués par ELISA au jour de sacrifice (n = 8 rats/groupe). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * $P < 0.05$. Groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938)57

Figure 19 : Expression de S100A8/A9 et des cytokines associées chez les rattes Wistar sensibilisées par voie intra-gastrique de caséine sans adjuvant (avant 1ier jour, après 58ème jour). Niveaux de S100A8/A9 (a), TLR4 (b), TNF- α (c), NF- κ B (d), IL-1 β (e) et IL-6 (f) dans le sérum des rattes de différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n= 8 rats/groupe). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. Groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec

la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938) 59

Figure 20 : Nombre d'éosinophiles (/mm³) dans le sang déterminé par technique d'hémogramme chez les rattes Wistar (n = 8 rats/ groupe) sensibilisées par voie intra-gastrique de caséine sans adjuvant (avant 1er jour, après 58ème jour). Les valeurs sont des moyennes ± SEM. * P < 0.05 95

Figure 20 : Nombre d'éosinophiles (/mm³) dans le sang déterminé par technique d'hémogramme chez les rattes Wistar (n = 8 rats/ groupe) sensibilisées par voie intra-gastrique de caséine sans adjuvant (avant 1er jour, après 58ème jour). Les valeurs sont des moyennes ± SEM. * P < 0.05 61

Figure 21 : Nombre de bactéries déterminé par la technique de l'ensemencement sur gélose sélective (n = 8 rats/groupe). Des rattes Wistar ont été sensibilisées par voie intra-gastrique par l'administration de caséine sans adjuvant. Les rattes ont été gavées 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 UFC/mL (les fèces ont été collectées au 59ème jour). Le volume de la dose administrée était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution de PBS stérilisée. Les données MRS/MRS-cys : (a), TSA II/Hektoen : (b) sont présentées sous forme de moyenne ± SM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * P < 0.05. Groupe non traité (groupe témoin) ; groupe non sensibilisé et traité avec la souche SL42 (groupe SL42) ; groupe non sensibilisé et traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938) ; groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS) ; groupe sensibilisé à la caséine et traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) ; et groupe sensibilisé à la caséine et traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938)..... 21

Figure 22 : Effets des bactéries probiotiques sur les indices du thymus et de la rate. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de caséine sans adjuvant. Les indices du thymus et de la rate ont été mesurés par le rapport entre le poids du thymus ou de la rate au poids corporel. Les valeurs sont des moyennes ± SM (n= 8 rats/groupe). Aucune différence significative n'a été observée à P > 0,05.... 63

Figure 23 : Coupes histologiques représentatives de la muqueuse jéjunale et colorées à l'HE à un grossissement original de 100 µm. Des rattes Wistar ont été sensibilisées par voie intra- gastrique par l'administration de la caséine sans adjuvant. Les rattes ont été gavées tous les deux jours (du jour -3 au jour 58) avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à raison de 1×10^8 UFC/mL..... 64

Figure 24 : Schéma expérimental et groupes de rats examinés dans le cadre de la présente étude. L'ovalbumine a été utilisée comme allergène et administrée par voie intra-gastrique à des rattes sans adjuvant. 48 rattes femelles (âgées de 3 semaines) ont été réparties en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin

(groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 1938), groupe sensibilisé à l'OVA (groupe OVA), groupe sensibilisé à l'ovalbumine traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) et groupe sensibilisé à l'ovalbumine traité avec la souche DSM 19738 (groupe OVA+DSM 19738). Dans tous les groupes de rats traités aux bactéries, SL42 ou DSM 17938 ont été administrées 1/2 jour du jour -3 au jour 50..... 72

Figure 25 : Variation de la température corporelle (°C) et de score diarrhéique après 3h de défi à l'OVA. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Une différence significative a été observée à $P > 0,05$ 73

Figure 26 : Démangeaison et irritation de l'oreille et de la bouche chez les rats du groupe sensibilisé à l'OVA après 3h de défi 74

Figure 28 : Taux d'acide urique dans le sérum des rats avant (1er jour) et après (50ème jour) la provocation par l'OVA. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). * Des différences significatives ont été observées à $P < 0,05$75

Figure 29 : Variation du poids corporel (g) avant (1er jour) et après (50ème jour) de défi d'OVA. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Une différence significative observée à $P < 0,05$.76

Figure 30 : Les niveaux d'IgE OVA (a) et d'histamine (b) dans le sérum ont été déterminés par ELISA (n = 8 rats/groupe). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * $P < 0.05$. Groupe sensibilisé à l'OVA (groupe OVA) ; groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec SL42 (groupe OVA+SL42) ; groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938)..... 77

Figure 31 : L'effet de l'administration de la souche de référence DSM17938 et la souche SL42 isolée sur le nombre d'éosinophiles déterminé par la technique d'hémogramme. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM de 4 à 8 rats / groupe. Une différence significative observée à $P < 0,001$ 78

Figure 32 : Expression de S100A8/A9 et des cytokines associées chez le rat Wistar sensibilisé à la caséine sans adjuvant et par voie intra-gastrique (avant le 1er jour, après le 50ème jour). Niveaux de S100A8/A9 (a), TLR4 (b), TNF- α (c), NF- κ B (d), IL-6 β (e) et IL-1 (f) dans le sérum des rats de différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n= 8 rats/groupe). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. Groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à l'OVA (groupe CAS), groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) et groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938) 51.....80

Figure 33 : Nombre de bactéries déterminé par la technique de l'ensemencement (n= 8 rats/groupe). Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de l'OVA sans adjuvant. Les rats ont été nourris 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 UFC/mL (les fèces ont été collectées au 50ème jour). Le volume de la dose était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution PBS stérilisée. Les données (MRS, MRS-cys, TSA II, Hektoen) sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * $P < 0.05$. Groupe témoin (groupe C) ; groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42) ; groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938) ; groupe sensibilisé à l'OVA (groupe CAS) ; groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) ; et groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938)..... 82

Figure 34 : Effets des bactéries probiotiques sur les indices du thymus et de la rate des rats. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de l'ovalbumine sans adjuvant. Les rats ont été nourris 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 CFU/mL. Le volume de la dose était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution PBS stérilisée. Des échantillons de thymus et de rate de chaque groupe ont été prélevés au 50ème jour (jour du sacrifice). Les indices du thymus et de la rate ont été mesurés par le rapport entre le poids du thymus ou de la rate et le poids corporel du rat. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n= 8 rats/groupe).....83

Figure 35 : Coupes représentatives de la muqueuse jéjunale colorée à l'HE à un grossissement original de 100 μ m. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration d'ovalbumine sans adjuvant. Les rats ont été gavés 1/2 jours du jour -3 au jour 49 avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à raison de 1×10^8 UFC/mL.....84

Figure 36 : Aspect histo-pathologique des ganglions mésentériques du groupe qui a reçu l'ovalbumine seule (+OVA). Après le sacrifice, les mésentères ont été examinés pour mettre en évidence l'existence d'adénites (flèches), de follicules lymphoïdes (flèches) et de macrophages (flèches).....85

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale	1

Chapitre I : L'allergie alimentaire

I.1. Maladies allergiques : Problème de santé publique à l'échelle mondiale	5
I.2. Aspects épidémiologiques	6
I.3. Aspects étiologique.....	8
I.3. 1. L'hypothèse hygiéniste.....	8
I.3.2. Facteur de risque majeurs liée aux allergies alimentaires	9
I.3.3. Antioxydants, vitamines et acide gras	9
I.4. Signes cliniques	9
I.5. Allergènes alimentaires	11
I.6. Diagnostique.....	14
I.7. Traitement.....	17
I.8. Mécanisme de l'allergie alimentaire	17
I.8.1. Classification des allergies alimentaires	17
I.8.2. Les acteurs impliqués dans le mécanisme de la réaction allergique.....	19
I.8.1.1. Les immunoglobulines de type E et leurs récepteurs	19
I.8.1.2. Cellules de la touffe (Tuft cells)	21
I.8.1.4. Cellules T $\gamma\delta$	21

I.8.1.5. Cellule CD8+ T	21
I.8.1.6. Cellules épithéliales	21
I.8.1.7. Cellules lymphoïdes innées de type 2.....	21
I.9. Description du mécanisme de l'allergie alimentaire	23
I.10. Réactions d'allergie et d'intolérance aux aliments : quelles sont les différences entre-elles ?.....	26
I.11. Immunothérapie.....	27

Chapitre II : Bactéries lactiques probiotiques

II.1. Généralité sur les probiotiques.....	30
II.2. Rôle des bactéries lactiques probiotiques	31
II.3. Microbiote	33
II.4. Effets des probiotiques sur les maladies intestinales	35
II.5. Le microbiome et la régulation de l'allergie alimentaire.....	36
II.6. Colonisation microbienne favorise la production d'IgA et cytokines	38
II.7. L'allaitement : un facteur pour la suppression des allergies alimentaires.....	39

Chapitre III : Le rôle des bactéries probiotiques (*SL42*, et *L.reuteri DSM 17938*) du lait humain dans l'allergie alimentaire à la caséine bovine chez les rats Wistar juvéniles.

III.1. Introduction.....	42
III.2. Matériels et méthodes	43
III.2.1. Souches utilisées	43
III.2.2. L'identification du SL42 a été réalisée principalement par séquençage partiel des gènes 16S rRNA41..	44
III.2.3. Caractérisation du potentiel probiotique	44
III.2.3.1 Tests de pH et de tolérance biliaire.....	44
III.2.3.2. Détection de l'activité antimicrobienne.....	45
III.2.3.4. Activité hémolytique.....	46
III.2.3.5. Assimilation du cholestérol.....	46

III.2.3.6. Sensibilité aux antibiotiques	47
III.2.4. Étude in vivo	47
III.2.4.1. Hébergement des animaux	47
III.2.4. Conception expérimentale in-vivo	47
III.2.5. Évaluation des symptômes macroscopiques d'allergie à la caséine.....	49
III.2.6. Détermination des CAS-IgE spécifiques, de l'histamine, de S100A8/A9, des cytokines associées à l'inflammation et du nombre d'éosinophiles	49
III.2.7. Culture de bactéries à partir de matières fécales.....	50
III.2.8. Détermination de l'indice poids de la rate/poids corporel et de l'indice poids du thymus/poids corporel	50
III.2.9. Analyse histologique.....	50
III.2.10. Test de translocation bactérienne.....	50
III.2.11. Analyse statistique	51
III.3. Résultats.....	51
III.3.1. SL42 est un <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> , comme le confirme l'analyse de l'ARNr 16S	51
III.3.2. Potentielité probiotique de <i>L. rhamnosus SL42</i>	51
III.3.4. La calprotectine, les éosinophiles et les cytokines associées à l'allergie induite par le CAS ont été réduits avec succès dans le plasma des rats gavés avec la souche SL42	56
III.3.5. Le dénombrement des bactéries fécales.....	61
III.3.6. Poids de la rate et du thymus après utilisation de bactéries probiotiques.....	63
III.3.7. L'inflammation du tissu jéjunal.....	63
III.3.8. Mise en évidence de la sécurité des probiotiques par le test de la translocation bactérienne.....	64
IV.4. Discussion.....	65
IV.5. Conclusion	68

Chapitre III : Le rôle des bactéries probiotiques (*SL42*, et *L.reuteri DSM 17938*) du lait humain dans l'allergie alimentaire à l'ovalbumine d'oeuf chez les rats Wistar juvéniles.

IV.1. Introduction.....	69
IV.2. Matériels et méthodes	70
IV.2.2. Élevage des animaux	70
IV.2.3. induction e l'allergie à l'ovalbumine	71
IV.2.4. Analyse statistique	71
IV.3. Résultats.....	73
IV.3.1. Les symptômes macroscopiques suivant le gavage à l'ovalbumine.....	73
IV.3.2. les IgE spécifiques et le taux d'histamine associés à l'allergie induite par l'OVA.....	76
IV.3.3. La calprotectine, les éosinophiles et les cytokines associées à l'allergie induite par l'OVA.....	78
IV.3.4. Le dénombrement des bactéries LAB et de <i>Clostridia</i> dans les fécales.....	81
IV.3.5. Effets des lactobacilles sur le poids relatif de la rate et du thymus	82
IV.3.6. L'effet de l'administration des probiotique sur la morphologie intestinale	83
IV.4. Discussion.....	86
IV.5. Conclusion	90
Conclusion générale.....	91
Références	94
Annexe	110

Introduction générale

L'allergie alimentaire est définie comme "un effet indésirable sur la santé résultant d'une réponse immunitaire spécifique et qui se produit de manière reproductible lors de l'exposition à un aliment donné". Les allergènes alimentaires sont spécifiques de l'aliment reconnu par le système immunitaire de l'individu et qui est susceptible de provoquer chez lui des symptômes allergiques et caractéristiques. La réaction allergique est déclarée la plus grave et potentiellement mortelle lorsqu'elle est anaphylactique. Les autres réactions allergiques comprennent des manifestations gastro-intestinales telles que : vomissements, troubles de l'alimentation, reflux, douleurs abdominales, dysphagie, diarrhée, retard de croissance et selles sanglantes ; des manifestations cutanées telles que : urticaire, œdème de Quincke, bouffées vasomotrices, prurit et eczéma ; et des manifestations respiratoires telles que : respiration sifflante, dyspnée, congestion nasale, éternuements et rhinorrhée (**Luyt et al., 2014**).

La prévalence de l'allergie alimentaire est en augmentation dans le monde entier, avec une prévalence mondiale approchant les 10 %. L'épidémiologie de l'allergie alimentaire varie selon le groupe d'âge et la situation géographique. Les enfants présentent les taux plus élevés comparés aux adultes. L'allergie aux crustacés est plus fréquente dans les pays asiatiques, tandis que l'allergie à l'arachide est plus fréquente dans les pays occidentaux. Cette prévalence accrue de l'allergie alimentaire se produit principalement dans les pays occidentaux, tels que le Royaume-Uni, les États-Unis et l'Australie. Dans les autres pays, les données sur la prévalence des allergies alimentaires font défaut, en particulier dans les pays en développement, mais les données existantes indiquent que ces pays ne sont pas à l'abri (**Dos Santos et al., 2020**).

L'allergie alimentaire pourrait être une maladie potentiellement sérieuse. Cependant, il n'en existe pas encore de thérapies efficaces. La principale est d'éviter de consommer les aliments qui provoquent une réaction allergique. En cas de réaction allergique fulminante, un médicament à base d'adrénaline appelé épinéphrine sera injecté pour contrôler immédiatement les symptômes (**Sicherer et Simons, 2017**). Cette thérapie est censée à soulager complètement les allergies alimentaires, mais elle comporte parfois, un risque important de provoquer des réactions allergiques graves (**Chu et al., 2019**). Par conséquent, la mise en place d'un traitement sûr et efficace de l'allergie alimentaire est attendue.

Le dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale est l'une des causes des réponses immunitaires excessives à des antigènes alimentaires inoffensifs. La barrière épithéliale intestinale est responsable du maintien de l'homéostasie intestinale en limitant la pénétration

des bactéries et des allergènes alimentaires dans la partie luminale (Yu, 2012). En particulier, les jonctions serrées jouent un rôle important dans la fonction de la barrière intestinale. Dans l'allergie alimentaire, un défaut apparent de la barrière épithéliale a été constaté. Par exemple, les premières études cliniques chez les enfants allergiques au lait de vache ont montré une perméabilité intestinale plus élevée comparée à celle observée chez les enfants non allergiques (Jalonen, 1991). En outre, Le maintien de la fonction de la barrière intestinale pour empêcher l'entrée excessive d'antigènes dans la *lamina propria* de l'intestin est considéré comme important dans la protection contre l'allergie alimentaire.

La littérature souligne une relation entre le dérèglement du microbiote intestinal et l'incidence de l'allergie alimentaire. L'administration de probiotiques a été proposée comme étant efficace pour le traitement et la prévention de l'allergie alimentaire. La consultation d'experts conjointe de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, et de l'Organisation mondiale de la santé ont défini les probiotiques comme "des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte". L'hypothèse proposée semble un mécanisme faisant appel à l'activation des macrophages locaux, la modulation de la production locale et systémique d'IgA locale et systémique, ainsi qu'une modification du profil des cytokines pro- et anti-inflammatoires, conduisant à une amélioration de la santé de l'organisme. Les souches probiotiques rapportées comme ayant un effet modulateur sont *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacteria* spp, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Escherichia coli* souche Nissle 1917, *Enterococcus faecium* SF68, et *Saccharomyces boulardii* (Dos Santos et al., 2020).

La diversité et l'abondance du microbiote intestinal et de ses métabolites jouent un rôle important dans l'immunomodulation. Il existe des différences significatives dans la composition du microbiote intestinal entre les personnes allergiques et ceux en bonne santé (Bunyavanich et Berin, 2019). Sharma et Im (2018) ont rapporté une abondance de *Clostridia* et de Firmicutes chez les nourrissons allergiques au lait.

De même et chez le modèle animal, Abdel-Gadir et al. (2019) ont constaté que les souris recevant le microbiote intestinal de nourrissons sains développaient une tolérance immunitaire dont on a supposé qu'elle fût associée aux Clostridiales. Les souris sans germe et les souris dont le microbiote intestinal est peu diversifié produisent spontanément des niveaux élevés d'IgE au début de leur vie, mais leurs réponses allergiques s'améliorent si l'intestin est colonisé par divers micro-organismes par la suite. La composition du lait humain est très variable d'une mère à l'autre, ce qui peut affecter le développement du système immunitaire de l'enfant. Le lait humain

affecte également le microbiome du nourrisson et est associé à une incidence faible de l'allergie alimentaire. Des niveaux élevés de facteurs immunitaires du lait maternel (micro-organismes bénéfiques, IgA, cytokines, oligosaccharides) sont associés à un risque réduit d'allergie alimentaire chez le nourrisson. On ne sait toujours pas s'il s'agit d'une protection directe ou d'une protection transférée de biomarqueurs. Les études chez les animaux sont très bénéfiques dans la mesure de mettre en évidence les mécanismes potentiels de protection fournis contre les antigènes (**Kirsi et al., 2019**). Cependant, le mécanisme sous-jacent par lequel les probiotiques modulent la composition du microbiote intestinal, qui à son tour régule la maladie allergique, reste mal compris.

Récemment, il a été rapporté que les cellules dendritiques (CD) CD103⁺ dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin ont la capacité d'induire le développement des Tregs périphériques et de jouer un rôle central dans le développement des réponses immunitaires (**Tu et al., 2017**). Cependant, les fonctions des CD103⁺ dans le traitement probiotique des allergies alimentaires sont complexes, et la nature de la diapason entre les CD103⁺ et le microbiote intestinal reste incertaine. Il a été démontré que plusieurs bactéries intestinales ont des propriétés favorisant la production d'IgA. Cet effet régulateur facilite réciproquement l'homéostasie immunitaire intestinale de l'hôte, formant un cercle vertueux (**Kawamoto et al., 2014**). Des niveaux élevés d'IgA dans les muqueuses sont également associés à la suppression du développement de l'allergie (**Kukkonen et al., 2010**).

Dans cette étude, nous avons développé un protocole pour réduire l'allergénicité de deux protéines consommées à l'âge juvénile de croissance, en utilisant des bactéries lactiques à statut probiotique d'origine humaine. Ainsi, la présente thèse est structurée en quatre chapitres et est achevée par une discussion générale.

Le premier chapitre est une synthèse théorique qui traite l'allergie alimentaire dans sa globalité comme étant un problème de santé à l'échelle mondiale, les mécanismes qui la déclenchent, ce qui la différencie de l'intolérance alimentaire et les données scientifiques approuvées jusqu'à maintenant dans cette prévention utilisant les probiotiques. Le chapitre deux s'étale sur les données connues jusqu'à présent dans l'attribution du statut probiotique et avec un accent particulier sur les souches originaires du lait humain.

Le chapitre III traite la première partie expérimentale où la caséine d'origine bovine a été prise comme agent allergisant pour induire, sans adjuvant, l'allergie alimentaire chez le rat Wistar en âge juvénile. Ce chapitre a abouti à une publication internationale ayant fait le pivot de soutenabilité de cette thèse. Le chapitre IV résume nos expériences sur l'efficacité des

probiotique dans leur action anti-allergisante et /ou tolérogène au blanc d'œuf chez le même modèle murin.

Dans toutes les expériences relatées dans la présente thèse, les souches probiotiques étudiées sont une bactérie isolée du lait humain au niveau de notre laboratoire LMBAFS, la SL42, et qui est comparée à la souche probiotique *L. reuteri* DSM 17938.

Chapitre I

Allergie alimentaire

Chapitre I : L'allergie alimentaire.

I.1. Maladies allergiques : Problème de santé publique à l'échelle mondiale

Sous le terme de maladies allergiques sont désignés l'asthme, la rhinite ou rhino-conjonctivite allergique, la dermatite atopique et les allergies alimentaires. Ces maladies constituent un problème majeur de santé publique. En **2015**, l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) les classe en effet en quatrième position au regard du nombre de cas dans le monde après les cancers, les pathologies cardiovasculaires et le Sida. De plus, dans l'union européen, avec environ un tiers de la population concernée, les allergies représentent les maladies chroniques les plus fréquentes (**Cezmi et Ioana Agache, 2014**).

La sensibilisation allergénique est définie comme une réponse immunologique inadaptée de l'organisme face à son environnement. Elle se traduit biologiquement par une production élevée en IgE spécifiquement dirigées contre un allergène, auquel le sujet a été exposé. La sensibilisation allergénique est à distinguer de l'atopie, qui désigne une prédisposition génétiquement déterminée à synthétiser des IgE, aptitude se manifestant le plus souvent, durant l'enfance ou l'adolescence (**Perezabad, 2017**).

L'allergie alimentaire correspond à un ensemble de réactions IgE-dépendantes provoquées par l'ingestion, l'inhalation ou au contact d'un aliment. La majorité des allergies alimentaires survient au cours des premières années de vie, principalement au lait de vache, au blanc d'œuf, à l'arachide et aux fruits à coque. Sur le plan clinique, les symptômes diffèrent en matière de localisation et de sévérité : picotements sur les lèvres, la langue ou le pharynx, troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, ...), démangeaisons et éruptions cutanées, urticaire, gêne respiratoire, œdème de Quincke, choc anaphylactique (**Patel, 2019**).

Selon l'organisation mondial de la santé (**2021**), Le terme « **allergène** » désigne une substance généralement inoffensive, mais capable de déclencher une réponse qui prend sa source dans le système immunitaire et entraîne une réaction allergique chez certains individus. Dans le cas des aliments, il s'agit d'une protéine se trouvant dans l'aliment concerné, capable de déclencher une réponse chez les personnes qui y sont sensibles. Le terme « **allergie alimentaire** » désigne les réactions immunitaires indésirables à certaines protéines alimentaires, qui peuvent être à médiation IgE (immunoglobuline E), sans médiation IgE, ou mixtes. Le terme « **intolérance alimentaire** » désigne des réactions indésirables à des composants alimentaires qui résultent de mécanismes non immunologiques.

L'« **hypersensibilité** » désigne la réaction indésirable répétée à un allergène ou une autre substance alimentaire en lien avec une allergie alimentaire à médiation IgE, des réactions immunologiques sans médiation IgE, ou une intolérance alimentaire (p. ex., sulfites, lactose).

I.2. Aspects épidémiologiques

En Algérie, comme dans de nombreux pays sous-développés, les réseaux d'épidémiologie-surveillance des allergies alimentaires n'ont pas encore été mis en place pour pouvoir juger objectivement de l'augmentation de la prévalence ou évaluer l'incidence des incidents allergiques. Le service de surveillance pédiatrique en Europe a été créé en 1986 pour surveiller l'évolution des maladies infantiles rares, mais a d'importantes implications en matière de santé publique. Au Canada, le programme canadien de surveillance pédiatrique comprenait la surveillance de l'anaphylaxie entre janvier 2000 et décembre 2001, mais ne se limitait pas à l'anaphylaxie d'origine alimentaire. En 2013, *Ibsaine* rapporte dans la ville d'Alger que chez les enfants moins de 12 mois l'incidence de l'APLV est de 1,8 % dont 1,1 % forme IgE-médiée (**Ibsaine et al., 2013**). L'allergie aux protéines de lait de vache est méconnue et il existe peu d'études avec une seule étude limitée démarrée en 2015 impliquant la wilaya de Constantine une étude épidémiologique de 2020 sur l'APLV dans neuf provinces du nord-est de l'Algérie avec un échantillon de 9305 enfants âgés de 0 à 3 ans. L'étude (tableau 1) a montré une prévalence assez élevée de 3,17% des enfants de moins de trois ans. Le seul remède à cette pathologie est l'élimination complète de toutes les protéines du lait sous leur forme intacte et l'utilisation de substituts adaptés, le plus souvent des hydrolysats de protéines d'origines diverses (**Boughellout et al., 2015**).

Dans le contexte médical algérien et avec la pénurie des hydrolysats protéiques, l'absence totale de solutions d'acides aminés et l'impossibilité de se procurer des stylos auto-injecteurs d'adrénaline, l'induction orale met l'enfant allergique à l'abri de l'accident anaphylactique sévère (**Attia et al., 2020**).

L'étude ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) est une étude internationale des maladies allergiques chez les enfants. Il s'agit d'un programme international de recherche épidémiologique initié en 1991 en réponse à l'augmentation rapide de la prévalence des maladies allergiques dans les pays occidentaux et en développement. Il vise de mieux comprendre les facteurs de risque de ces maladies, tout en impliquant un grand nombre de centres à travers le monde (**ISAAC Handbook, 2016**).

Tableau 1: La prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) en Algérie ville de Constantine 2015 (**Boughellout et al., 2015**).

Tranche d'âge	Effectif total	Effectif allergique	Effectif confirmé	Effectif non confirmé
0-3 mois	155	2.58	0.65	1.94
3-6 mois	171	2.34	1.75	0.58
6-9 mois	89	8.99	5.62	3.37
9-12 mois	172	1.74	1.16	0.58
12-18 mois	73	00	00	00
18-36 mois	110	8.18	4.55	3.64

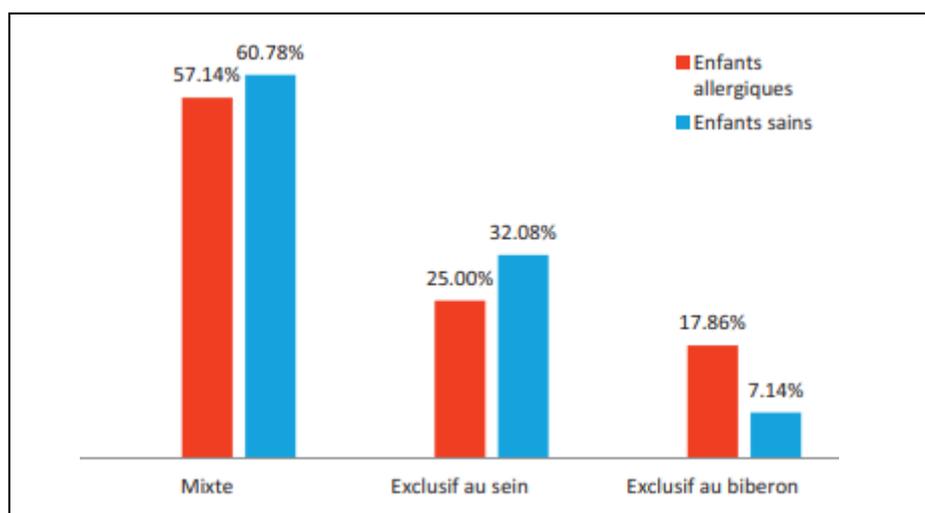


Figure 1 : Type d'allaitement reçu par les enfants allergiques et sains (**Boughellout et al., 2015**).

Les centres ISAAC sont identifiés par les régions suivantes : Afrique, Asie, Méditerranée orientale, Sub-Pacifique, Continent indien, Amérique latine, Amérique du Nord, Europe du Nord et Europe de l'Est, Océanie et Europe de l'Ouest (divisée en 3 phases, Figure 2). ISAAC Research a récemment conçu et développé une quatrième phase pour développer et étendre la portée du site Web ISAAC (Mallol *et al.*,2012).



Figure 2 : Distribution géo-spatiale de la prévalence des symptômes actuels de l'allergie en fonction de l'altitude et l'âge (13-14 ans). Chaque symbole représente un centre. Les quatre symboles représentent différents niveaux de prévalence des symptômes combinés à leur catégorisation en tant que basse ou haute altitude. Les étoiles rouges indiquent une prévalence élevée des symptômes actuels de l'allergie ($\geq 10\%$) et une altitude élevée ($\geq 300\text{m}$) ; les diamants jaunes indiquent une prévalence élevée des symptômes actuels de l'allergie et une faible altitude ; les cercles verts indiquent une faible prévalence des symptômes actuels de l'allergie et une altitude élevée ; et les carrés bleus indiquent une faible prévalence des symptômes actuels de l'allergie et une faible altitude (Mallol *et al.*,2012).

I.3. Aspects étiologique

I.3. 1. L'hypothèse hygiéniste

La multiplication relative aux symptômes des maladies allergiques a conduit à l'émergence de plusieurs hypothèses dites hygiénistes, expliquant qu'une hygiène excessive dans la première année de vie et la petite enfance conduit à l'immaturité du système. Augmentant ainsi le risque de maladie allergique (Castan *et al.*, 2016). Diverses études soutiennent cette théorie. Par

exemple, l'exposition à des agents pathogènes tels que *Helicobacter pylori* ou *Mycoplasma tuberculosis* réduit l'incidence des maladies allergiques (**Ege *et al* 2011 ; Bach, 2002 ; Feary *et al* ., 2011**). Un autre facteur de protection est lié au fait de grandir dans un environnement agricole, notamment la consommation de lait cru et le contact avec des animaux de ferme comme les vaches (**von Mutius et Vercelli 2010**).

Ces habitudes hygiéniques sont la réduction de plusieurs maladies infectieuses majeures, et contribuait à la maturation du système immunitaire du nourrisson. Selon ce Hypothétiquement, un environnement riche en microbes est essentiel à la maturation de la réponse immunitaire normale, prévenant ainsi les allergies (**Brunekreef *et al.*, 2012 ; Solis *et al.*, 2014**).

I.3.2. Facteur de risque majeurs liée aux allergies alimentaires

Les maladies allergiques peuvent s'aggravait par plusieurs facteurs socio-économiques et génétiques ; tels qu'une perméabilité intestinale accrue facilitent le passage des allergènes. Une exposition accrue à l'alcool, à l'aspirine ou anti-inflammatoire non-stéroïdiennes, des infections virales et parasitaires et mycoses intestinales, la présence d'antécédents personnels d'atopie, reflux gastro-œsophagien (RGO), des otites récurrentes, les angines à répétition, et en dernier le surpoids et obésité (**Zhou, 2014 ; Dano *et al.*, 2015 ; Hendaus *et al.*, 2016 ; Singh *et al.*, 2018**).

I.3.3. Antioxydants, vitamines et acide gras

Les antioxydants et les vitamines jouent un rôle important dans la maturation et le développement du système immunitaire (**Mazzocchi *et al.*, 2017**) et surtout pour l'enfant grâce à son effet protecteur contre les allergies alimentaires (**Garcia-Larsen *et al.*, 2016**). Autrement dit que les aliments (**tableau 2**) riches en oméga-6 peuvent être un facteur de risque pour l'enfant car ils détruisent les réactions immunitaires et par la suit mène au maladies atopiques (**Kim *et al.*, 2016**).

I.4. Signes cliniques

L'allergie alimentaire est une maladie atopique majeure qui est une réponse anormale à la nourriture déclenchée par des antigènes protéiques alimentaires normalement inoffensifs médiée par les immunoglobulines E (IgE) avec apparition rapide des symptômes soit non IgE médiée avec apparition tardive des symptômes (**Anagnostou *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2016**).

Tableau 2: Revue des facteurs de risque avérés et potentiels de la sensibilisation allergénique (Garcia-Larsen *et al.*, 2016).

Catégories de facteurs	Facteur de risque
Facteur individuels	<ul style="list-style-type: none"> - Sexe masculin ↑ - Antécédents familiaux maladie allergique (maternels > paternels) - Poids à la naissance (gros poids) - Saison de naissance (en hiver par acariens/ en été par pollens) - Poids (surcharge pondérale)
Facteurs en lien avec l'hypothèse hygiéniste	<ul style="list-style-type: none"> - Environnement de vie (milieu urbain) - Expositions aux microorganismes bactériens - Accouchements par césarienne - Mode de vie anthroposophie (agent protecteur)
Microbiote intestinales	<ul style="list-style-type: none"> - Une flore intestinal pauvre et non diversifiée - Dysbiose de la flore intestinales
Facteurs en lien avec la nutrition	<ul style="list-style-type: none"> - Type d'allaitement (allaitement maternel est un facteur protecteur) - Apport alimentaire pauvre en antioxydants - Apport alimentaire pauvre en vitamine D et oméga 3 - Consommation élevée de l'alcool - Non consommation des pré- et probiotique - Introduction de toutes les catégories d'aliment avant l'âge de 6 mois - Exposition aux trophallergènes avant l'âge de 9 mois.

L'exposition aux allergènes alimentaires déclenche des symptômes cliniques tels que la dermatite (Bidat, 2006), les maladies gastro-intestinales et l'inflammation des voies respiratoires et digestive c'est prédominantes chez les enfants s'aggravent avec l'âge et peuvent être fatales (Yu *et al.*, 2016). Les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire sont variées (tableau 3). Elles peuvent être généralisées (choc anaphylactique) ou avoir pour cible des organes comme la peau (urticaire, angioedème, dermatite atopique), les muqueuses (œdème, conjonctivite), l'arbre respiratoire (asthme, rhinite), le tube digestif (régurgitations, vomissements, constipation, diarrhée, malabsorption, œsophagite à éosinophiles), le système neurologique (asthénie, léthargie, hypotonie) ou de plusieurs organes simultanément. La dermatite atopique est le symptôme le plus précoce d'allergie alimentaire, représentant 80% des troubles cliniques chez le nourrisson (Skripak *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Score de gravité de l'allergie alimentaire (Nonnotte, 2016).

Grade 0	Aucun symptôme
Grade 1	Douleur abdominale isolée et résolutive, rhino-conjonctive, urticaire modérée.
Grade 2	Un organe impliqué : douleur abdominale nécessitant un traitement, urticaire généralisée, angio-œdème, toux ou chute du débit respiratoire
Grade 3	Deux organe impliqués
Grade 4	Trois organes impliqués ou asthme nécessitant un traitement ou angio-oedème laryngé ou chute tensionnelle accompagnant d'autres symptômes
Grade 5	Symptômes respiratoires ou/et cardiovasculaires nécessitant une hospitalisation en soin intensifs

I.5. Allergènes alimentaires

Tous les aliments peuvent être impliqués dans les allergies alimentaires, dont la susceptibilité humaine et en fonction de l'âge. La connaissance des aliments en cause est importante pour guider le bilan allergologique (Kirstin *et al.*, 2023).

La variabilité de la prévalence des allergies dues aux aliments observés en termes d'allergènes, révèle en effet, des propriétés structurales et immunogènes propres à chaque allergène. Un allergène est un antigène environnemental qui est reconnu par le système immunitaire et qui peut provoquer des allergies chez certaines personnes. Les allergènes alimentaires (tableau 4), également appelés allergènes nourrissants, sont généralement des molécules de nature protéique, glycoprotéique ou lipoprotéique, issues d'aliments (lait, cacahuètes, etc.), d'une taille généralement comprise entre 5 et 50 kDa. Cependant, les allergènes glucidiques pourraient également déclencher des allergies, comme l'oligosaccharide galactose alpha-1, 3-galactose (ou alpha-gal), qui provoque certaines allergies à la viande (Woodfolk *et al.*, 2015).

Tableau 4 : Les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfants et l'adulte
(Moneret-Vautrin, 2008).

Allergènes	0-1an (147enfants %)	1-3 ans (359 enfants %)	3-15 (468 enfants %)	Adultes 287%
- Œuf	77.5	69.6	24.3	6.3
- Lait	29.2	25.6	7	3.5
- Arachide	19.7	37.6	49.3	10.1
- Fruits à coque	2.7	4.4	10.2	15.7
- Légumineuses	0.6	4.4	13.4	5.9
- Poisson	0.6	5	10	3.1
- Prunoïdées	0	0		
- Banane,	0.6	0	0	31.3
avocat, kiwi		1.3	5.3	22.6
- Apaisées	0			
- Blé, céréales	6.1	0	1.7	16.4
		6.4	2.7	13.2

Les observations enregistrées dans la base des données du CICBAA correspondent aux critères diagnostiques établis par le groupe de travail de l'académie européenne d'allergologie et d'immunologie clinique sur 974 observations pédiatriques et sur 287 observations chez l'adulte.

De plus, il est important de noter que l'allergénicité des aliments et de leurs composants varie selon la méthode de préparation (Liu *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2019). Par exemple, les arachides grillées contiennent plus d'allergènes d'arachide Ara h 1 et 3 que les arachides cuites. De plus, les allergènes des cacahuètes grillées se lient plus fortement aux IgE dans le sérum des patients allergiques (Beyer *et al.*, 2001) et sont plus rapidement internalisés par les cellules dendritiques dérivées des monocytes (Cabanillas *et al.*, 2001, 2018). De même, chauffer du lait ou faire bouillir des œufs réduit leur allergénicité (Leonard *et al.*, 2015).

En réalité, un allergène est défini comme une substance, généralement une protéine, qui est reconnue par les anticorps IgE présents dans le sérum des personnes allergiques. Toutefois, un allergène qui peut à la fois sensibiliser et provoquer une réaction allergique est appelé allergène " complet " ou allergène de classe I (**Labrosse et al., 2020**). D'autre part, certaines protéines peuvent provoquer des symptômes allergiques sans pour autant être capables de sensibiliser, on les appelle allergènes incomplets ou allergènes de classe II.

Selon les homologies de séquences en relation avec la préservation de leur structure et leurs fonctions biologiques potentielles, environ 65% des allergènes d'origine végétale se répartissent en quatre superfamilles : la superfamille des prolamines, qui comprend notamment les protéines de transfert des lipides, les albumines 2S, les inhibiteurs de trypsine et d'amylase, et la superfamille des cupines, qui contient les protéines de réserve (Tableau 5). Des familles d'allergènes d'origine végétale moins sévères ont également été décrites comme étant composées de lectines ou de chitinases (**Sampson et al., 2014**). Des familles d'allergènes d'origine végétale moins sévères ont également été identifiées.

Tableau 5 : Principales familles et super familles d'allergènes d'origines végétales (**Sampson et al., 2014**).

Super familles	Familles	Principales sources	Exemple d'allergènes
Prolamines	Protéines de réserves des céréales	Céréales, arachides, fruits à coques	Tri a19(w5-gliadin, blé), Tri a 26(LMW gluténines, blé)
	LTP		Tri a 14 (blé), Ara h8 (cacahuète), Cora 8 (noisette)
	Albumines 2S		Ara h2 (cacahuète)
	Inhibiteurs alpha-amylase et trypsine		Tri a 20, 28,29 (blé)
Cupines	Globulines 11S, 12S	Légumineuse, oléagineuse	Ara h3 (cacahuète)
	Globulines 7S		Ara h1 (cacahuète)
Profollines		Fruits et légumes	Api g 4 (céleri)
Bet v 1	PR-10	Fruits et légumes	Mal d 1(pomme)

Environ 60 % des allergènes d'origine animale ont été regroupés en trois grandes familles : les tropomyosines, les parvalbumines et les caséines ; d'autres familles d'allergènes plus mineures ont également été identifiées, notamment les lipocalines, les lysozymes, les transferrines et les serpines (**Jenkins *et al.*, 2007 ; Sampson *et al.*, 2014**) (Tableau 6).

Les produits animaux doivent être suffisamment différents de leurs homologues humains pour être allergènes (**Jenkins *et al.*, 2007**).

Tableau 6 : Principales familles d'allergènes d'origine animale (**Jenkins *et al.*, 2007 ; Sampson *et al.*, 2014**).

Familles	Principales sources	Exemples d'allergènes
Tropomyosines	Crustacés, mollusques	Pen a 1 (Crevette)
Parvalbumines	Poissons, amphibiens	Sal s 1 (Saumon)
Caséines	Lait	Bos d 8 (Vache)
Serpines	Œuf	Gal d 2 (Poule)

Les allergènes ont certains sites spécifiques appelés épitopes de deux existe deux types d'épitopes : Les épitopes de type B qui sont capables de produire une antigénicité, se lient aux IgE produites par les lymphocytes B et les épitopes de type T, qui sont capables d'interagir avec les lymphocytes T.

I.6. Diagnostique

Identifier le patient souffrant d'une allergie alimentaire peut s'avérer difficile, car les symptômes peuvent être non spécifiques à effectuer vue que difficile à établir. Une étude approfondie est nécessaire pour orienter les tests ultérieurs et exclure d'autres diagnostics. Les facteurs pertinents à évaluer sont les suivants : symptômes et allergène suspecté, nombre d'occurrences, quantité d'aliments ingérés, méthode de préparation des aliments, relation avec l'exercice physique, relation avec l'ingestion d'alcool, durée des symptômes, présence de symptômes sans ingestion d'aliments et proximité des symptômes avec l'exposition. Les allergies alimentaires à médiation IgE se manifestent généralement dans les minutes qui suivent l'ingestion, tandis que les intolérances alimentaires peuvent se manifester quelques heures plus

tard. Une exacerbation de l'eczéma peut être observée quelques heures après l'ingestion d'un allergène alimentaire (**Ogrodowczyk et al., 2020**).

Si les symptômes ne correspondent pas à une réaction mettant la vie en danger, un journal alimentaire ou un régime d'élimination spécifique à un allergène suivi d'une réintroduction ou d'une provocation peut être envisagé afin d'établir une relation corrélative (**Hernandez et al., 2018**). Ceci est différent d'une provocation orale, qui est guidée par l'allergologue. L'allergie alimentaire doit être envisagée chez les patients présentant des symptômes médiés par les IgE, chez les adultes atteints d'œsophagite éosinophile (EoE) et chez certains enfants plus âgés atteints de dermatite atopique modérée à sévère, d'EoE ou d'entéropathie, car ils sont associés à une allergie alimentaire et à une sensibilisation précoce (**Green et al., 2017**). De plus, des études suggèrent qu'une suspicion plus élevée d'allergie alimentaire peut être justifiée chez les patients atteints de troubles gastro-intestinaux éosinophiles ou de maladies intestinales inflammatoires (**Kotlyar et al., 2014**).

De nombreux tests d'allergie alimentaire sont désormais disponibles par le biais de la publicité directe auprès des consommateurs. Cependant, bon nombre de ces tests sont coûteux et ne reposent que sur des preuves limitées. Le test de provocation orale en double aveugle est la référence en matière de diagnostic. Il consiste à administrer au patient des doses croissantes de l'allergène alimentaire suspecté tout en surveillant les symptômes cliniques. Cependant, ce test n'est pas facilement disponible, est souvent coûteux et peut entraîner des réactions graves (**Fishbein et al., 2020**).

Si le risque de réaction est modéré, un test buccal supervisé aura lieu pour établir un diagnostic définitif. Si le risque est très faible, il suffit de recommander au patient d'introduire progressivement chez lui les aliments déclencheurs suspectés. D'autres tests disponibles ne sont pas recommandés par les directives du National Institute of Allergy and Infectious Diseases en raison de leur manque de normalisation ou de validation : tests intradermiques, IgE totaux, IgG spécifique ou IgG4, analyse minérale des cheveux, kinésiologie appliquée, électrodermotest, thermographie faciale et provocation allergénique et endoscopique. Toutefois, une étude récente a montré que la provocation allergénique endoscopique est un test prometteur pour la sensibilisation de l'œsophage chez les patients atteints d'EoE et qu'elle mérite d'être explorée plus (**Warners, 2018**). La sensibilisation aux allergènes est définie comme la présence d'IgE sériques spécifiques aux allergènes (sIgE) (**Boyce et al., 2010 ; Soares-Weiser et al., 2014**). L'augmentation de la taille de la roue ou des niveaux de sIgE peut être corrélée à la probabilité

d'allergie. Cependant, un résultat positif (figure 3) peut indiquer une sensibilisation aux allergènes sans allergie alimentaire véritable. L'absence de symptômes corrélés rend le test non diagnostique. De telles constatations disparates devraient conduire à des diagnostics alternatifs, tels que l'intolérance alimentaire, les allergies non médiées par les IgE ou les allergènes alternatifs.

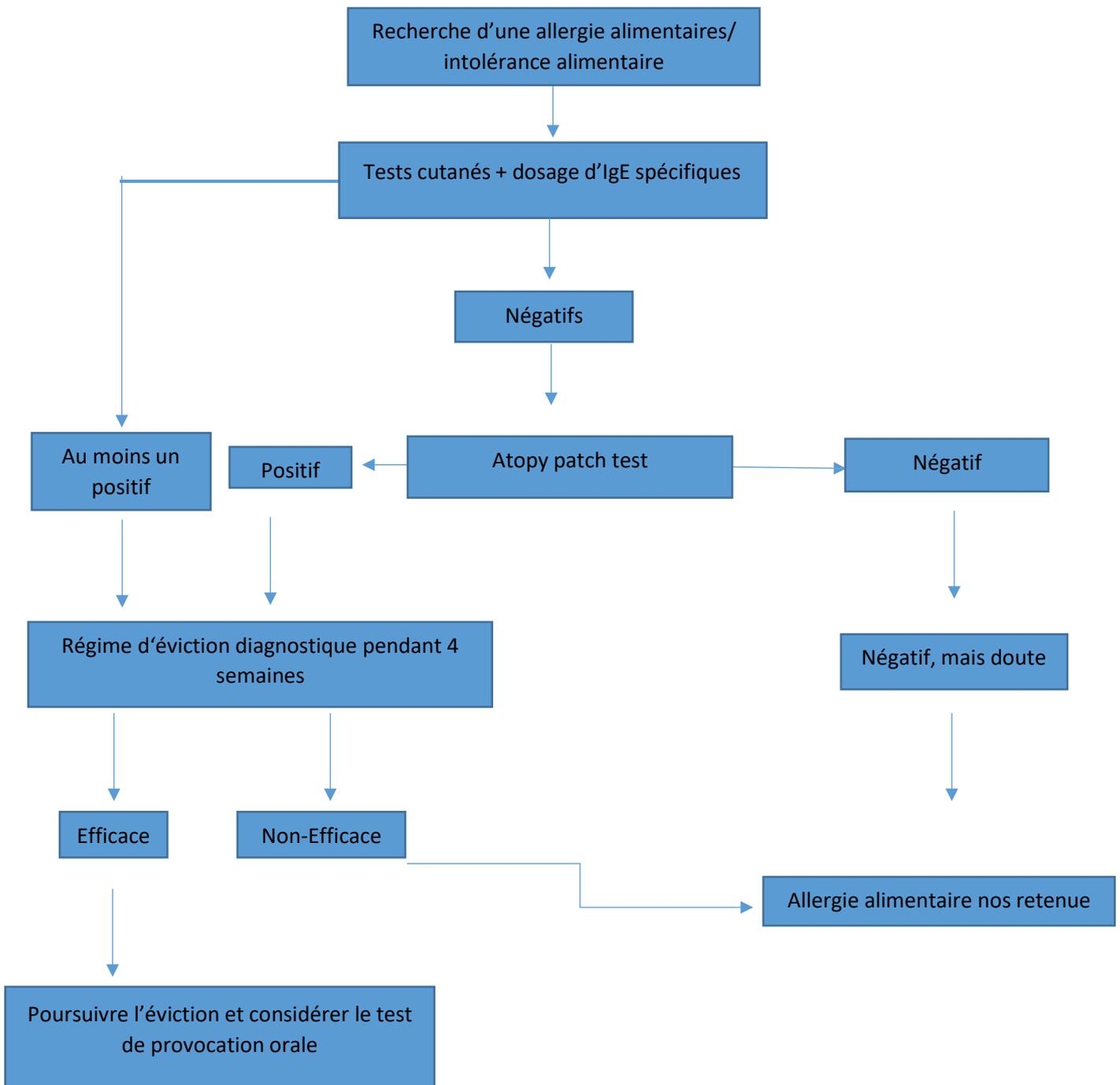


Figure 3 : L'arbre décisionnel pour le diagnostic d'une allergie alimentaire (Kose, 2019).

I.7. Traitement

Le traitement des allergies alimentaires repose sur la maîtrise de l'environnement alimentaire. Après une évaluation soigneuse des allergies, le régime d'éviction correspond à une prescription médicale et n'inclut pas les allergènes identifiés. Lorsqu'il est bien fait, il est très efficace : 83 % des personnes atteintes de dermatite atopique liée aux allergies alimentaires se sont améliorées en deux mois et 33 % se sont rétablies en six mois. La collaboration avec un nutritionniste professionnel est essentielle pour expliquer les régimes spécifiques, assurer l'équilibre nutritionnel et faire des recommandations. En à la ligne alternative à l'expulsion, le médecin peut compléter le régime en prescrivant des médecines douces (calcium, fer...), définir les paramètres de suivi clinique et en fixant la durée du régime avant le prochain bilan.

La mise en place de mesures d'éviction doit être globale, en prenant en considération l'exposition aux allergènes des autres sources : peau (cosmétiques), médicaments, allergènes dans les tétines ou les jouets, allergènes dans l'environnement, et risque de réactivité croisée venant d'animaux d'élevage (oiseaux, chats, chiens, etc.). La mise en œuvre d'un programme d'éducation au traitement est essentielle pour permettre aux patients et à leurs familles de gérer leur alimentation et leur environnement allergique (**Kolopp-Sarda *et al.*, 1998**). Les médecins éviteront de prescrire des médicaments qui favorisent ou aggravent la condition Manifestations cliniques de l'allergie alimentaire : bêta-bloquants, Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), aspirine et anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Sicherer *et al.*, 2018**).

I.8. Mécanisme de l'allergie alimentaire

Les maladies atopiques se manifestent souvent par une progression appelée march1-3 atopique. Les premières manifestations des maladies atopiques dans l'enfance sont souvent la dermatite atopique, qui évolue progressivement vers une allergie alimentaire, une rhinite allergique et un asthme allergique (**Gargano *et al.*, 2021**).

I.8.1. Classification des allergies alimentaires

Classification des allergies alimentaires Les allergies alimentaires sont des troubles atopiques qui peuvent être classés en trois grandes catégories : celles qui sont médiées par les IgE, celles qui sont médiées à la fois par des voies IgE-dépendantes et IgE-indépendantes (mixtes) et celles qui ne sont pas médiées par les IgE (Tableau 7). Les allergies alimentaires sont mécaniquement distinctes des troubles non atopiques, tels que la maladie cœliaque.

Tableau 7 : Classification des allergies alimentaires (**Eigenmann et al., 2000 ; Silverberg et al., 2013 ; Hruz, 2014**).

Sous-type	Prévalence	Groupe affecté	Allergènes communs	Symptôme
Allergie alimentaire à médiation IgE	0,4-10%	Enfants > adultes	Lait, œuf, blé, soja, arachide, noix, crustacés et poissons	Démangeaisons, urticaire, Œdème de Quincke, douleurs abdominales, vomissements, respiration sifflante et hypotension
Allergie alimentaire mixte à médiation IgE et cellulaire				
a- Associé à une allergie alimentaire atopique dermatite atopique	27 à 37 % des patients dermatite atopique	Enfants > adultes	Lait, œuf, blé, soja, arachide, noix, crustacés et poissons	Aggravation de la dermatite allergène (en plus des l'allergie alimentaire à médiation IgE d'une allergie alimentaire à médiation IgE)
b- EoE	Jusqu'à ~50 patients pour 100000	Enfants et adultes (ratio hommes/femmes de 3:1)	Lait, blé, œuf, bœuf, soja et poulet	Vomissements, retard de croissance, dysphagie, impaction alimentaire et brûlures d'estomac
c- Autres éosinophile gastro-intestinaux (EC, EG ou EGE)	Rare	- EC : enfants en bas âge - EG : adultes > enfants - GEE : adultes	- EC : lait et soja - EG : éventuellement lait, blé, soja, œuf, noix, fruits de mer et rouges - EGE : peut ne pas avoir l'étiologie de l'allergie alimentaire	Les manifestations varient en fonction de la région et de la couche du tractus gastro-intestinal (muqueuse) touchées.

Allergie alimentaire non IgE-médiée	a- FPIES	Peu de données : une étude rapporte que 0,34 % des nourrissons atteints de FPIES ont été exposés au lait de vache.	Nourrissons et enfants	Lait, soja, riz, avoine et œuf	- Intermittent exposition aux allergènes : vomissements sévères - Exposition chronique aux allergènes chronique : diarrhée et retard de croissance
	b- FPIP	0,16 % de nourrissons présentant un FPIP potentiel au lait de vache	Enfant	Lait, soja, blé et œuf	Hémorragie rectale
	c- FPE	Peu de données	Peu de données Nourrissons et enfants en bas âge	Lait, soja, blé et œuf	Stéatorrhée due à malabsorption, diarrhée et retard de croissance

EC : colite à éosinophiles ; **EG** : gastrite à éosinophiles ; **EGE** : gastro-entérite à éosinophiles ; **EoE** : oesophagite à éosinophiles ; **EPIT** : immunothérapie épicutanée ; **FPE** : entéropathie aux protéines alimentaires ; **FPIES** : syndrome d'entéocolite induite par les protéines alimentaires ; **FPIP** : proctocolite induite par les protéines alimentaires.

I.8.2. Les acteurs impliqués dans le mécanisme de la réaction allergique

I.8.1.1. Les immunoglobulines de type E et leurs récepteurs

Les immunoglobulines E (IgE) sont des anticorps naturellement présents dans l'organisme, de forme de Y composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Ces anticorps sont produits par les plasmocytes dérivés des lymphocytes B, suite à un contact avec un allergène. Ils sont des médiateurs de la réponse allergique : leur présence en grande quantité témoigne

donc d'une allergie ou d'un terrain allergique (on parle d'atopie), qui a été découverte et caractérisée en 1966 par Kimishige Ishizaka.

Lors de réactions allergiques, les IgE spécifiques se fixent au récepteur de haute affinité, FcRI, exprimé à la surface des mastocytes et des basophiles. La liaison de l'allergène aux IgE induit une agrégation des IgE et de leurs récepteurs ; ce qui provoque une activation cellulaire conduisant à la libération de médiateurs inflammatoires (**Galli et al., 2008**). Il existe un autre récepteur sur lequel les IgE peuvent également se fixer, à savoir le récepteur dit de faible affinité FcRII, (CD23) (**Acharya et al., 2010**). CD23 (figure 4) est exprimé principalement à la surface des lymphocytes B mais est également présent sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques folliculaires, les éosinophiles et les plaquettes. Au niveau des lymphocytes B, CD23 entraîne généralement une régulation négative de la synthèse des IgE.

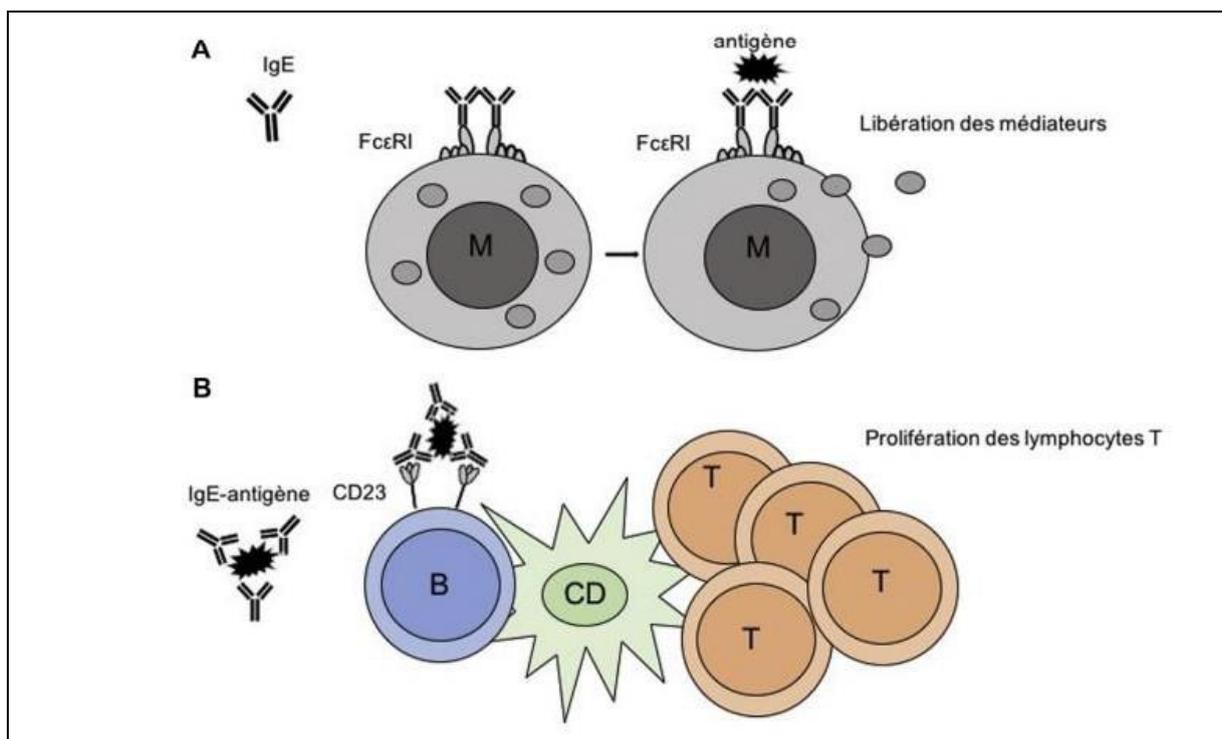


Figure 4 : Modèles d'interaction de l'IgE avec les deux récepteurs, FcR et CD23. A) Les IgE libres peuvent se lier au FcRI sur les mastocytes (M) et après l'agrégation avec l'antigène induire une réaction inflammatoire conduisant à la libération des médiateurs. B) Les complexes IgE-antigène se fixent préférentiellement sur le CD23 présent à la surface des lymphocytes B. Le transfert des complexes IgE-antigène aux cellules dendritiques (CD) induit la présentation de l'antigène et la prolifération des lymphocytes T (**Stolk et al., 2020**).

Il a aussi été démontré que CD23 permet l'internalisation des complexes immuns à IgE conduisant à une augmentation de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (**Stolk et al., 2020**). Ceci conduirait à une suppression de la synthèse de l'IgE et à une augmentation de la réponse IgG.

I.8.1.2. Cellules de la touffe (Tuft cells)

Ce sont des cellules constitutives de l'épithélium de l'intestin grêle qui sécrètent l'interleukine-25 (IL-25) pour maintenir l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s). Dans certaines conditions, les cellules de la touffe peuvent induire les ILC2 à sécréter de l'IL-13, initiant ainsi une réponse médiée par les cellules T helper 2 (TH 2) à médiation cellulaire (**von Moltke et al., 2016**).

I.8.1.4. Cellules T $\gamma\delta$

Présentes dans l'épithélium intestinal et la lamina propria, ces cellules peuvent moduler et contribuer à la dégradation de la tolérance orale chez la souris, et pourraient jouer un rôle similaire chez l'homme (**von Moltke et al., 2016**).

I.8.1.5. Cellule CD8+ T

Ces cellules peuvent influencer les manifestations gastro-intestinales de l'allergie alimentaire. Une augmentation du nombre de cellules CD8+T a été observée pour la 1er fois dans un modèle d'œsophagite éosinophile chez la souris, et il a été signalé que les cellules CD8+T suppriment la diarrhée déclenchée par les allergènes alimentaires (**Haitao et al., 2020**).

I.8.1.6. Cellules épithéliales

Cellules des muqueuses intestinales et respiratoires et de la peau qui sécrètent la lymphopoïétine stromale et thymique (TSLP), IL-25 et IL-33, ces cytokines tendent à susciter une réaction des cellules TH 2 par le biais de leurs actions sur les cellules dendritiques (DC) et les ILC2157. Les mutations de la filaggrine altèrent la fonction de barrière épithéliale et peuvent être associées à un risque accru de dermatite atopique et d'allergie alimentaire (**Cecilia Berin et al., 2021**).

I.8.1.7. Cellules lymphoïdes innées de type 2

Les ILC2 peuvent être influencés par le TSLP, l'IL-25 ou l'IL-33 pour sécréter l'IL-5 et l'IL-13, qui favorisent les réponses immunitaires médiées par les cellules TH2 (**Lund et al., 2013**).

Les Mastocytes

Les mastocytes assurent la libération immédiate et différée de médiateurs inflammatoires et leur activation est une caractéristique de la maladie atopique (Kim *et al.*, 2016).

Monocytes CD14+

Ces cellules sont présentes dans une proportion plus élevée que les cellules T CD4+ (figure 5) dans le sang du cordon des nourrissons qui développeront des allergies alimentaires. Les monocytes CD14+ sont hyper-réactifs aux lipopolysaccharides (LPS), sécrétant des niveaux élevés de cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6 et de facteur de nécrose tumorale en réponse à la stimulation du LPS (Zhang *et al.*, 2016).

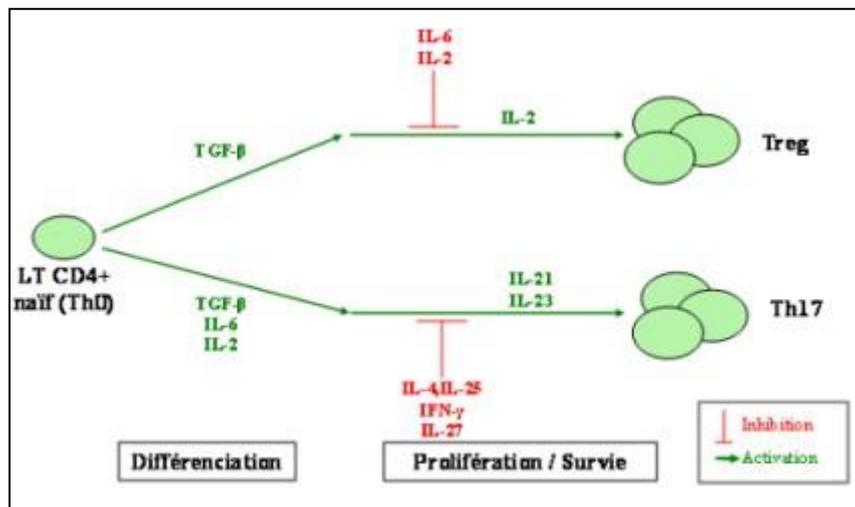


Figure 5 : Régulation réciproque des cellules Treg et Th17 (Zhang *et al.*, 2016).

A- Basophiles

Les basophiles constituent la plus petite fraction des globules blancs circulant dans le sang et se différenciant sous l'influence de l'IL-3 (Arock, 2004). Leurs inclusions cytoplasmiques contiennent de nombreuses molécules chimiques, en particulier l'histamine, la sérotonine et l'héparine (Malveaux *et al.*, 1978).

B- Eosinophiles

Les granulocytes éosinophiles ou polynucléaires éosinophiles sont des cellules sanguines de la lignée blanche. Présentes chez les chordés, elles sont impliquées dans le système immunitaire inné (figure 6), notamment dans les phénomènes d'allergie et de parasitisme. L'IL-5 et l'éotaxine stimulent la différenciation et la migration de la lignée éosinophile.

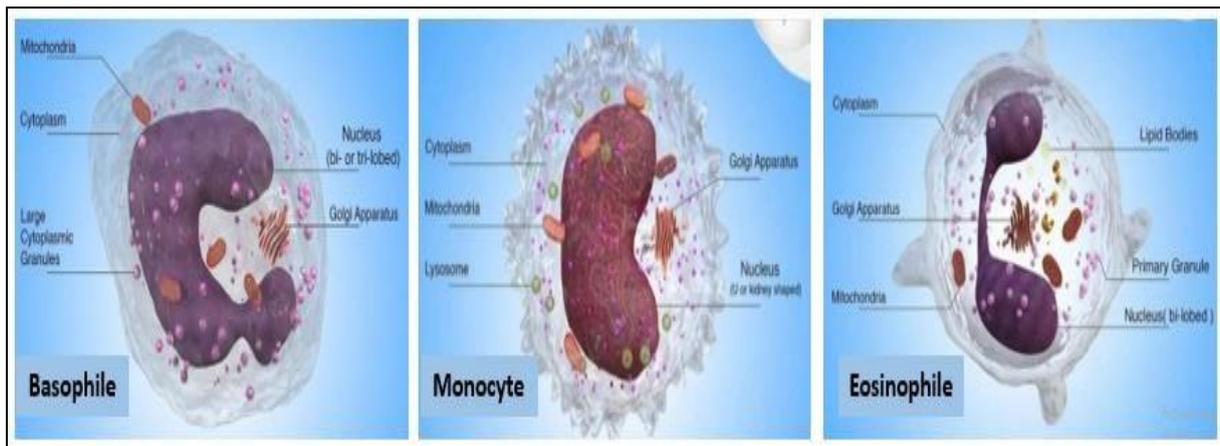


Figure 6 : Cellules lymphoïdes innées (Zhang *et al.*, 2016).

I.9. Description du mécanisme de l'allergie alimentaire

Pour la santé globale, il est essentiel que le système immunitaire distingue les antigènes pathogènes des antigènes environnementaux innocents. En conséquence, un état de non-réponse aux antigènes alimentaires est plus courant chez les individus non allergiques (en d'autres termes, en bonne santé ou immunotolérants) (Berin, 2015). Chez les personnes atteintes d'une allergie alimentaire, la sensibilisation aux allergènes alimentaires entraîne des réponses immunitaires inflammatoires et inappropriées aux aliments. De nombreux essais cliniques sur l'allergie alimentaire visent à établir une tolérance immunitaire fonctionnelle à la place de cette sensibilisation. Cette sensibilisation se produit au niveau du tractus gastro-intestinal (Han *et al.*, 2012).

Les cellules CX3CR1+ (très probablement des macrophages) étendent leurs dendrites entre les cellules épithéliales intestinales, prélèvent des antigènes dans la lumière intestinale et transfèrent les antigènes capturés *via* les jonctions *gap* aux cellules dendritiques (CD) CD103+. (Sampson *et al.*, 2018). Un sous-ensemble de ces DCs migre de la *lamina propria* vers les

ganglions lymphatiques drainants où les DCs expriment le facteur de croissance transformant- β (TGF β) et l'acide rétinoïque, induisant ainsi les cellules T naïves (figure 7) à se différencier en cellules T régulatrices (Treg) (**Li et Zheng, 2015**).

Les macrophages semblent également sécréter de l'interleukine-10 (IL-10), ce qui entraîne la prolifération des cellules Treg. Toutefois, ce point est controversé (**Liébana-García et al., 2023**). Plusieurs types de cellules T régulatrices (au repos, effectrices et de mémoires) ont été signalées comme étant associées à la tolérance muqueuse, notamment les cellules Treg induites par la boîte de forkhead P3 (FOXP3)⁺, les cellules Tr1 sécrétant de l'IL-10 et les cellules T helper 3 (TH3) sécrétant du TGF β (**Zhang et al., 2014**). L'acide rétinoïque induit également l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ par les cellules Treg, ce qui entraîne une migration vers l'intestin où les cellules Treg peuvent amortir la réponse immunitaire (**Paulo Czarnewski et al., 2017**). Les CD103⁺ échantillonnent également les antigènes qui traversent la barrière épithéliale par transcytose médiée par les cellules M ou par translocation par les cellules à gobelet sécrétant de la mucine. Dans certaines circonstances, les DCs CD103⁺ peuvent capturer les antigènes de la lumière directement par périscopie (extension d'un processus à travers une jonction serrée) ou en étendant un processus à travers un pore transcellulaire dans une cellule M (**Ali et al., 2020**).

Les clones de cellules B exprimant des anticorps spécifiques des allergènes alimentaires peuvent subir un changement d'isotype dans les organes lymphoïdes secondaires avec l'aide des cellules T auxiliaires folliculaires (TFH). La tolérance alimentaire et la désensibilisation aux allergènes sont associées aux IgA et aux IgG4, respectivement (**Frossard et al., 2004 ; Sugimoto et al., 2016**). En revanche, les IgE spécifiques des allergènes alimentaires seront liées par le Fc ϵ RI sur les mastocytes (qui se trouvent normalement dans les tissus formant des barrières environnementales (**Abbas et al., 2021**) et les basophiles, entraînant ainsi des réactions d'hypersensibilité immédiates aux aliments. L'exposition à de fortes doses d'antigènes oraux a été signalée comme conduisant à l'anergie ou à la suppression des cellules T spécifiques de l'antigène, probablement après l'interaction des CD (**Tanaka et al., 2019**). Les cellules TFH sécrétant des différentes combinaisons de cytokines favorisent la recombinaison des cellules B pour produire des isotypes d'anticorps particuliers, tandis que les cellules Treg folliculaires suppriment la réaction du centre germinal (**Gonzalez-Figueroa et al., 2021**).

Les rôles des cellules T résidant dans les tissus, des cellules T CD8⁺ et des cellules T $\gamma\delta$ restent à déterminer. La relation entre les cellules TFH et les sous-ensembles conventionnels

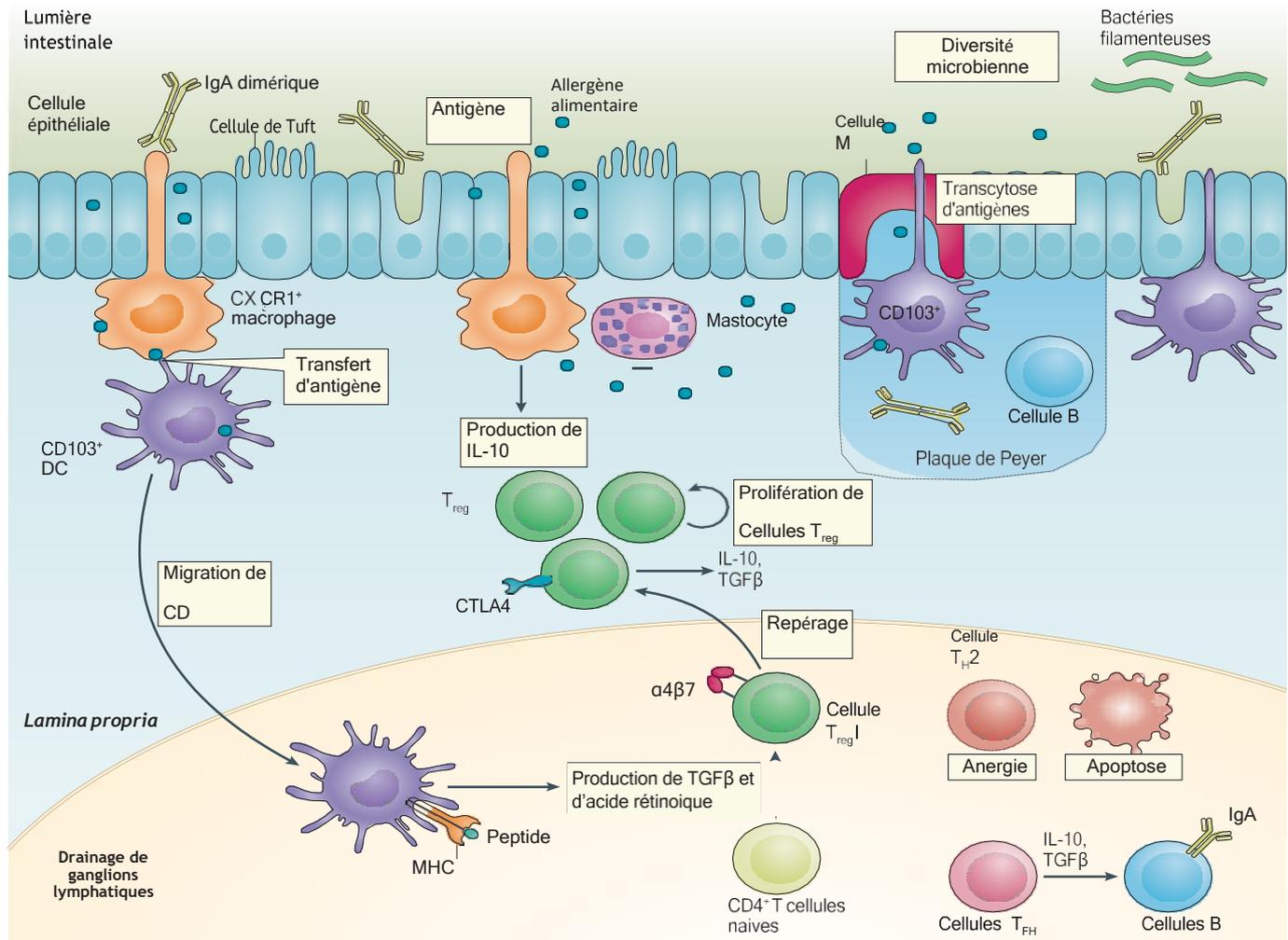


Figure 7 : Tolérance immunitaire aux antigènes oraux dans l'intestin (Yu *et al.*, 2016).

de cellules TH n'est pas claire, et une conversion entre les deux a été signalée CTLA4, antigène du lymphocyte T cytotoxique (Ballesteros-Tato *et al.*, 2016).

Les lésions épithéliales ou l'inflammation (par exemple, en raison d'une exposition à une toxine ou d'un traumatisme) dans l'intestin, la peau ou les voies respiratoires permettent une entrée accrue d'antigènes et favorisent la sécrétion de cytokines dérivées de l'épithélium : interleukine-25 (IL-25), IL-33 et lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) (Borgia *et al.*, 2021). Ces médiateurs " orientent " le système immunitaire vers une réponse des cellules T helper 2 (TH 2) et on pense que la sensibilisation initiale aux allergènes alimentaires a souvent lieu au niveau

de la peau (**Kalb et al., 2022**). En particulier, la TSLP peut favoriser la différenciation des cellules dendritiques (CD) en un phénotype favorisant les cellules TH2 (**Borgia et al., 2021**). Par exemple, OX40L peut être régulé à la hausse dans les CD qui favorisent la différenciation des cellules TH2 des cellules T CD4+ naïves. La sécrétion d'IL-25 par les cellules de la touffe épithéliale peut également favoriser l'expansion des populations de cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) (**Gurram et al., 2023**), qui avec les cellules TH2, sécrètent des cytokines favorisant la réponse immunitaire médiée par les cellules TH2 (**Mirchandani et al., 2014**). Le résultat est l'accumulation d'éosinophiles dans les tissus et le changement de classe des IgE par les cellules B (**Kanagaratham et al. 2019**). Les cellules TH9 contribuent également à la réponse immunitaire et allergique en augmentant l'accumulation de mastocytes dans les tissus tissulaire (**Penagos et Durham, 2022**) et la signalisation médiée par l'IL-4 peut convertir les cellules T régulatrices en cellules TH2 (**Noval Rivas et al., 2015**).

I.10. Réactions d'allergie et d'intolérance aux aliments : quelles sont les différences entre-elles ?

L'ingestion de certains aliments et produits alimentaires induit un large éventail de réactions indésirables allant de l'anaphylaxie légère à l'anaphylaxie mortelle. En fonction de l'étiologie, ces réactions indésirables sont classées en deux catégories : les réactions à médiation immunitaire, appelées allergies alimentaires et les affections à médiation non immunitaire, appelées intolérances ou sensibilités alimentaires (**Turnbull et al., 2015**). En raison de la similitude des symptômes, l'allergie et l'intolérance alimentaire sont imprévisibles. Comme il n'existe pas de traitement standard, le remède possible pour éviter de s'exposer à ces réactions indésirables consiste au respect d'un régime alimentaire strict qui élimine les aliments allergènes et intolérants. En plus, il existe divers aliments dont le mécanisme d'action dans le déclenchement de l'allergie et de l'intolérance alimentaire reste à définir.

Les réactions non immuno-médiées sont des réactions indésirables à un composant alimentaire dans lesquelles le système immunitaire humain ne joue pas un rôle direct, sont souvent dose-dépendantes et ne sont pas systématiquement reproductibles. Elles peuvent être causées par plusieurs mécanismes, tels que : les propriétés particulières d'un aliment ingéré (c'est-à-dire un composant toxique ou pharmacologiquement actif : comme la caféine ou l'alcool), l'absence d'une enzyme particulière permettant de digérer les nutriments ou des nutriments trop faibles pour être complètement digérés (**Brough et al., 2020**). Néanmoins, il est temps de reconnaître les modifications du microbiote intestinal (c'est-à-dire la dysbiose) comme l'un des principaux mécanismes contribuant au développement des intolérances

alimentaires et comme un événement clef dans le passage d'une intolérance alimentaire potentielle (par exemple: un manque génétique de lactase) d'une forme subclinique /asymptomatique à une condition symptomatique manifestée.

D'autre part, une réaction immuno-médiée est un effet indésirable reproductible sur la santé résultant d'une réponse spécifique du système immunitaire. Sur la base du mécanisme immunologique impliqué, une réactions immuno-médiée peut être classée comme suit : (a) IgE-médiée, c'est-à-dire médiée par des anticorps appartenant à l'immunoglobuline E (IgE) ; (b) non-IgE ; un groupe hétérogène d'allergies alimentaires dans lequel il existe une réaction immunitaire contre les composants de l'aliment, mais dont la pathogénie primaire n'est pas un produit des IgE mais impliquant un mécanismes à médiation cellulaire ; et (c) mixte, dans laquelle des mécanismes immunologiques à médiation IgE et à médiation cellulaire sont impliqués dans la réaction (**Datema et al., 2019**).

Les allergies alimentaires mixtes et non médiées par les IgE restent un défi difficile pour les cliniciens. Le diagnostic des AG non IgE et mixtes reste un diagnostic d'exclusion (figure 8) et est essentiellement clinique, à l'exception des entéropathies induites par les protéines alimentaires (FPE) et des troubles gastro-intestinaux à éosinophiles (EGID), pour lesquels une confirmation histologique est nécessaire. Malheureusement, les AG non IgE et mixtes sont fréquemment impliqués dans l'apparition de symptômes gastro-intestinaux chez les enfants et les adultes, mais restent probablement sous-diagnostiqués et les protocoles fondés sur des preuves pour diagnostiquer et traiter ces maladies, font défaut (**Cianferoni et Spergel, 2016**).

I.11. Immunothérapie

Les réactions indésirables aux aliments affectent de nombreux patients dans le monde, les allergies alimentaires touchent un faible pourcentage de la population mais peuvent mettre la vie en danger. Les cliniciens doivent maintenir un haut niveau de suspicion lorsqu'ils évaluent un patient présentant des réactions indésirables possibles à un aliment, afin de déterminer si une allergie alimentaire est en cause ou si la réaction est due à l'une des nombreuses autres réactions à médiation non immunitaire.

Une anamnèse détaillée et des tests d'allergie orientés vers les antécédents permettent de distinguer l'allergie alimentaire des réactions alimentaires non immunitaires (**Oriel et Wang, 2019**). L'interdiction des allergènes reste le pilier du traitement. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires en ce qui concerne les pharmacothérapies, telles que

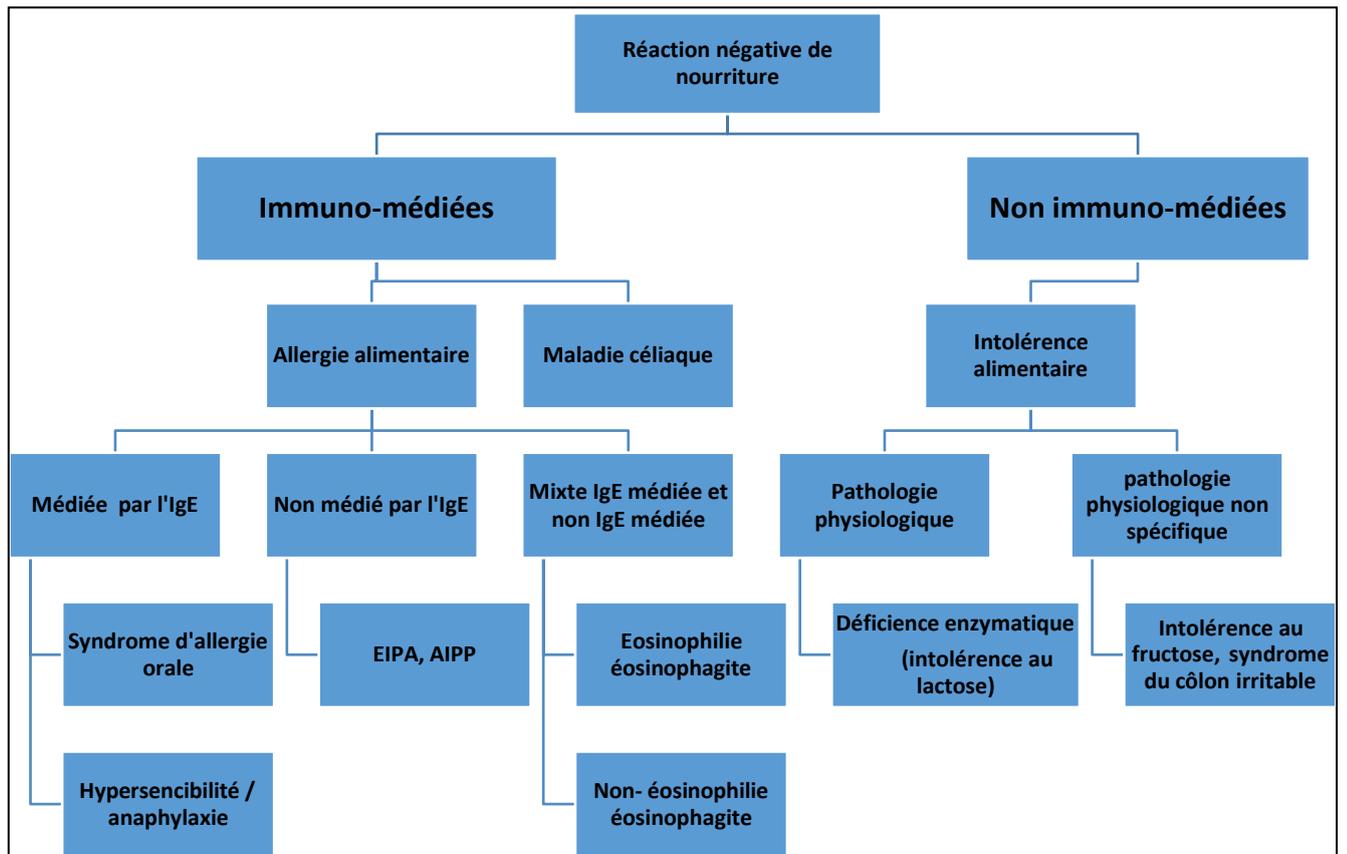


Figure 8 : Classification des effets indésirables des aliments (Baker et Sampson, 2018).
 Entérocolite induite par les protéines alimentaires (EIPA) ; Allergies induites par les protéines
 protocolaire (AIPP).

l'immuno-stimulation spécifique aux allergies, la thérapie anti-IgE et l'immunothérapie peptidique. Le seul traitement préventif efficace, logique et peu coûteux des allergies alimentaires est l'expulsion stricte et ciblée de l'aliment en question. Il s'agit en premier lieu d'établir un diagnostic fiable pour éviter de prescrire une alimentation trop restrictive et déséquilibrée chez des patients polysensibilité sans véritable allergie, à l'origine d'une carence sévère (Oriel et Wang, 2019).

Il est parfois difficile en pratique d'éliminer un certain nombre d'allergènes présents dans les nombreux aliments (ex : cacahuètes, lait, œufs), alors les conseils d'un nutritionniste professionnel peuvent aider à établir un régime d'élimination efficace tout en maintenant une alimentation équilibrée. Le bannissement des aliments nécessite une identification précise des allergènes problématiques dans les allergies multiples fréquentes.

Par conséquent, l'élimination doit d'abord prouver sa responsabilité. La proscription totale d'un certain nombre d'allergènes (parfois sous forme d'aliments cachés) communs à de nombreuses formulations s'avère parfois impossible et nécessite une attention particulière du patient à la lecture des étiquettes des produits. De plus, la réglementation n'oblige pas l'industrie alimentaire à mentionner les aliments en très petites quantités dans les produits finis, ce qui signifie que les étiquettes ne garantissent pas nécessairement une information adéquate pour les personnes allergiques. A l'exception de certains allergènes, comme les cacahuètes chroniquement allergiques, le régime d'exclusion se poursuit pendant un an, après quoi un nouveau bilan immuno-allergique peut être envisagé avant de réévaluer prudemment les aliments exclus.

En plus du régime d'exclusion, les patients présentant des symptômes d'allergies alimentaires aiguës et graves (c.-à-d. anaphylaxie, œdème de Quincke ou bronchospasme) devraient se voir offrir une trousse d'épinéphrine auto-injectable portative, sous-cutané (ANAHELP®, ANAKIT®, ANAPEN®) conserver à température ambiante et une carte d'allergie.

Un traitement médical indispensable avec des antihistaminiques quotidiens : du kétotifène ou des stabilisateurs de la membrane mastocytaire (cromones : cromoglycate disodique), a été proposé pour limiter les conséquences d'une exposition accidentelle à des allergènes apparentés et y parvenir avec plus ou moins de succès (**Scurlock et Jones, 2017 ; Oriel et Wang, 2019**).

Chapitre II

Bactéries lactiques probiotiques

Chapitre II : Bactéries lactiques probiotiques.

II.1. Généralité sur les probiotiques

La définition du terme « probiotique » a d'abord été proposée par **Lilly et Stillwell** en **1965** pour décrire les substances sécrétées par un micro-organisme qui stimulent la croissance d'un autre organisme et améliorent l'équilibre de la flore intestinale.

La définition a ensuite évolué et Roy Fuller a redéfini en 1989 les probiotiques « comme des compléments alimentaires microbiens ayant des effets bénéfiques sur l'hôte par l'amélioration de l'équilibre microbien intestinal » (Fuller, 1989). La définition actuelle repose sur celle établie en juillet 2002 par un groupe d'experts réunis par la Food and Agriculture Organisation (FAO) des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, produisent un bénéfice sur la santé de l'hôte ». Depuis 2009, dans plusieurs rapports, l'EFSA a estimé que les souches déjà mise sur le marché n'étaient pas assez caractérisées et/ou que les allégations santé utilisées pour les préparations probiotiques manquaient de preuves scientifiques validées par des études cliniques. Certaines souches ont des applications commerciales intestinales et vaginales avec, en guise d'exemple, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (BioGaia) retrouvé dans plusieurs pharmacie agréé le groupe IPA (ingrédient pharmaceutique actif) (**Xu et al., 2015**).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, tolérantes aux acides, méso-aérophiles, non sporulées, morphologiquement en forme de bâtonnets (bacilles) ou de sphères (cocci) qui produisent de l'acide lactique comme principal produit final de la fermentation des hydrates de carbone. Cette propriété fondamentale a historiquement lié les bactéries lactiques (LAB) à la conservation des aliments, car un pH faible permet d'inhiber la croissance et la prolifération des micro-organismes contaminants (**Matib et al., 2020**).

En outre, l'acide lactique et d'autres métabolites produits par la fermentation contribuent également à la saveur des produits alimentaires. En raison de leur longue histoire d'utilisation dans les produits alimentaires à travers les cultures starters et leur présence dans la chaîne alimentaire, les LAB ont également obtenu le statut important dans les industries alimentaire et nutraceutique (**Huligere et al., 2023**).

Au fil des années, la classification taxonomique des LAB a subi de nombreux changements.

En 2020, une réorganisation taxonomique des bactéries lactiques a reclassifié plus de 300 espèces de 7 genres et de 2 familles dans une seule famille, les Lactobacillaceae (figure 9), avec 31 genres comprenant *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* et 23 nouveaux genres qui comprennent des organismes auparavant classés comme espèces *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

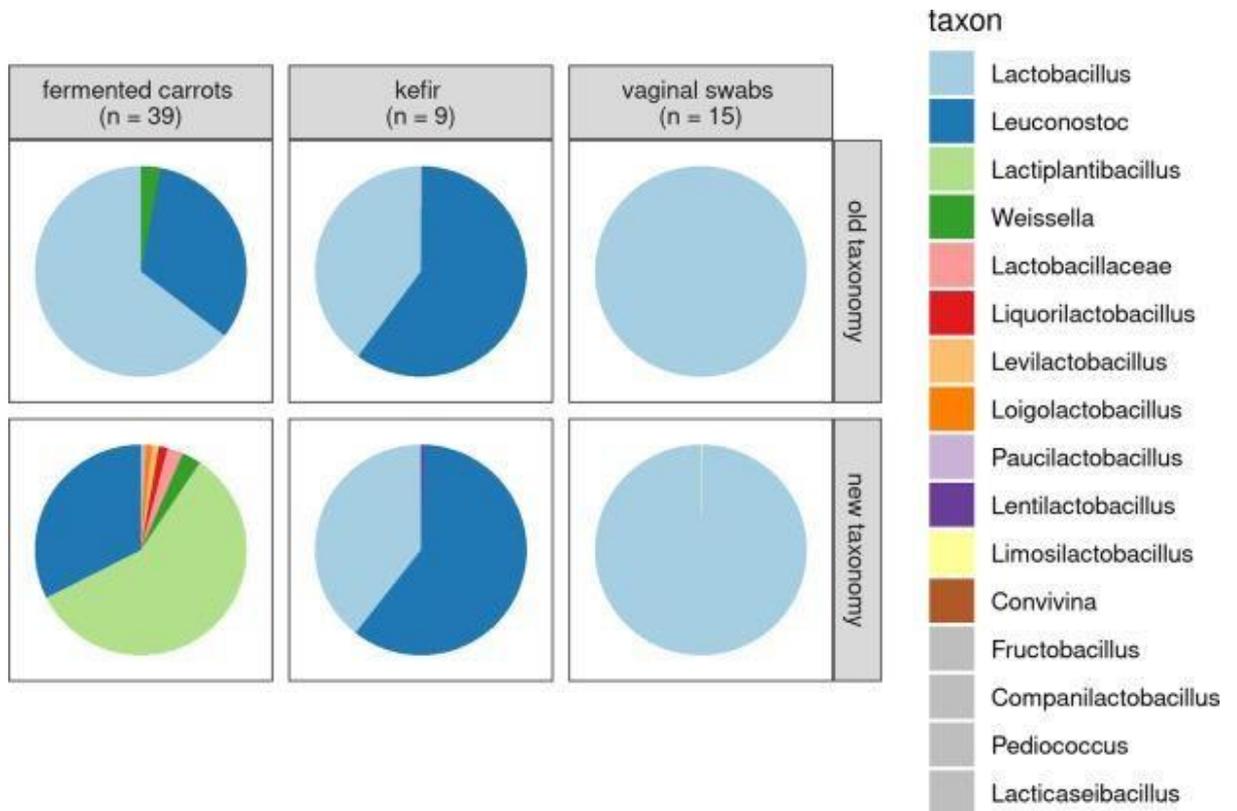


Figure 9 : Distribution moyenne des genres Lactobacillaceae, par rapport à l'abondance totale des Lactobacillacées, dans les échantillons de 30 jours de fermentations de jus de carotte (à gauche), dans les prélèvements de kéfir (au milieu), et dans les sécrétions du vagin humain (à droite) (Qiao *et al.*, 2022).

II.2. Rôle des bactéries lactiques probiotiques

Les LAB pourraient produire une variété de métabolites bénéfiques, y compris des peptides antimicrobiens, des acides gras à courtes chaînes et l'acide lactique (Sánchez *et al.*, 2017).

Ainsi, la fermentation pilotée par les LAB préserve l'activité biologique et a une multitude d'effets bénéfiques pour la santé, tels que : l'amélioration de la valeur nutritionnelle des

aliments, prévention des infections intestinales, suppression des diarrhées associées aux antibiotiques, traitement de l'intolérance au lactose, renforcement de l'immunomodulation, traitement des aliments, le traitement des allergies alimentaires, effets anti-oxydants, effets anti-anxiété, amélioration du métabolisme des lipides et suppression des tumeurs (**Naumova *et al.*, 2018**).

Depuis l'antiquité, les produits fermentés contenant des micro-organismes vivants sont utilisés pour rétablir ou maintenir la santé. Au début du dernier siècle, le lauréat du prix Nobel et immunologiste russe « Elie Metchnikoff » a introduit l'idée de consommer des micro-organismes vivants bénéfiques pour améliorer la santé et augmenter la longévité (**Lortal *et al.*, 2020**).

Les mécanismes d'actions des probiotiques sont généralement complexes et varient selon les souches. Ils sont associés soit à la présence de ces microorganismes eux-mêmes et à leurs interactions avec la flore et/ou le microbiote (figure 10), soit aux substances qu'ils sécrètent (**Bermudez-Brito *et al.*, 2012**)

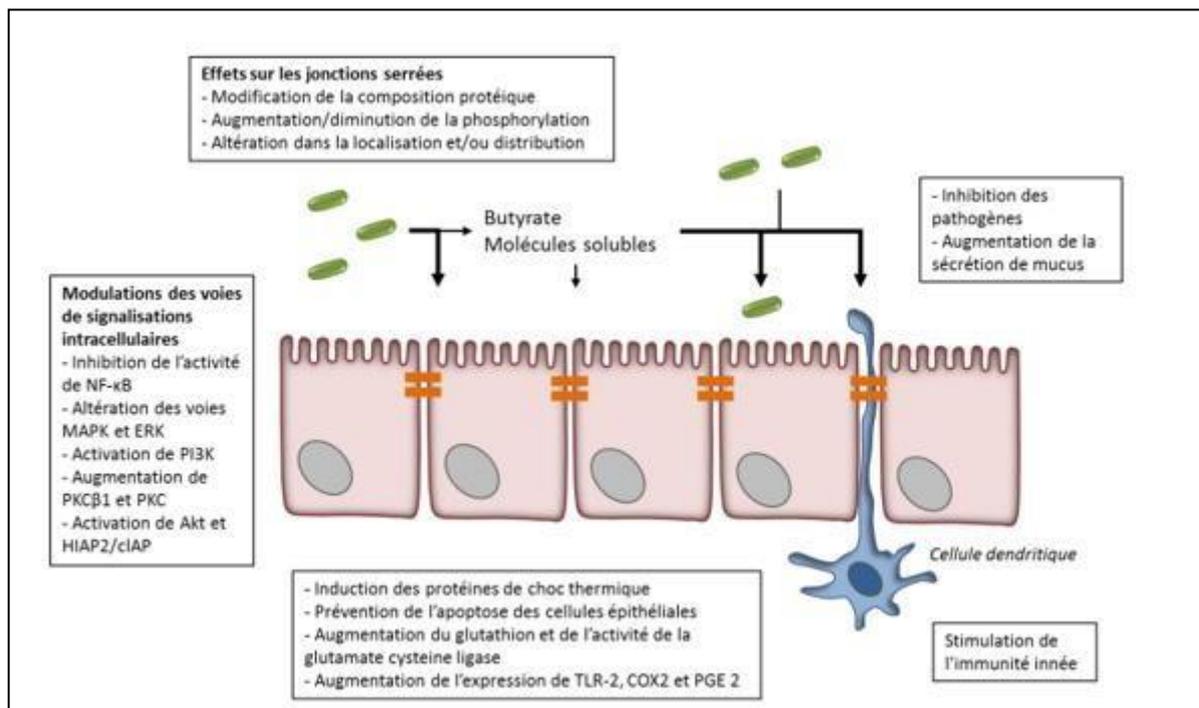


Figure 10 : Mécanisme d'action des probiotiques dans le renforcement de la barrière épithéliale (**Madsen, 2012**).

II.3. Microbiote

Le tractus gastro-intestinal représente l'une des plus grandes interfaces (250-400 m²) entre l'hôte et l'environnement et abrite 10¹⁴ micro-organismes, collectivement appelés microbiote (**Thursby et al., 2017**). Il est proposé que le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la santé de l'hôte. D'une part, de nombreuses bactéries commensales telles que les Firmicutes et les Lactobacillus sont considérées comme des probiotiques car leur présence dans l'intestin est bénéfique pour l'hôte (**Stojanov et al., 2020**). D'autre part, certains microbiotes, comme les gamma-protéobactéries et les entérobactéries, peuvent menacer l'intégrité de l'intestin ou même jouer un rôle pathogène dans les inflammations et les infections intestinales (**Rizzatti et al., 2017**).

Le microbiote intestinal fournit des nutriments et de l'énergie à l'hôte par la fermentation des aliments non digestes. Dans le gros intestin. Les principaux produits de la fermentation du substrat sont les acides gras à courtes chaînes (AGCC) qui interagissent avec le microbiote intestinal et les cellules de l'hôte. Le microbiote régule, par le biais de différents mécanismes, certaines fonctions physiologiques importantes de l'hôte, telles que celles liées à l'alimentation et à la santé (**Frampton et al., 2020**). Il peut également agir comme une barrière contre l'établissement d'agents pathogènes d'origine alimentaire. De manière remarquable, le microbiote intestinal est également en contact avec le deuxième plus grand réservoir de cellules neuronales (après le cerveau) de cellules du corps, ainsi qu'avec le plus grand groupe de cellules immunitaires de notre organisme (**Flint et al., 2012**).

Par conséquent, le microbiote conduit la maturation du système immunitaire dans la petite enfance et contribue au maintien de son homéostasie au cours de la vie (**Sjögren et al., 2009**). En outre, l'influence possible du microbiote dans le développement du système nerveux et dans la fonction cognitive constitue actuellement une cible privilégiée de la recherche biomédicale (**Hsiao et al., 2013**).

Dans un premier temps, les polymères (figure 11) sont dégradés en monomères par des hydrolases produites par des bactéries fibrolytiques (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*). Dans un deuxième temps, ces monosaccharides sont utilisés dans des voies de glycolyse pour former divers composés comme le pyruvate ou l'oxaloacétate. Ils seront ensuite métabolisés en AGCC (**Frampton et al., 2020**). L'acétate, le propionate et le butyrate sont les AGCC majeurs produits par le microbiote, ils se trouvent dans un rapport molaire d'environ 3: 1: 1, respectivement (**Canfora et al., 2015**).

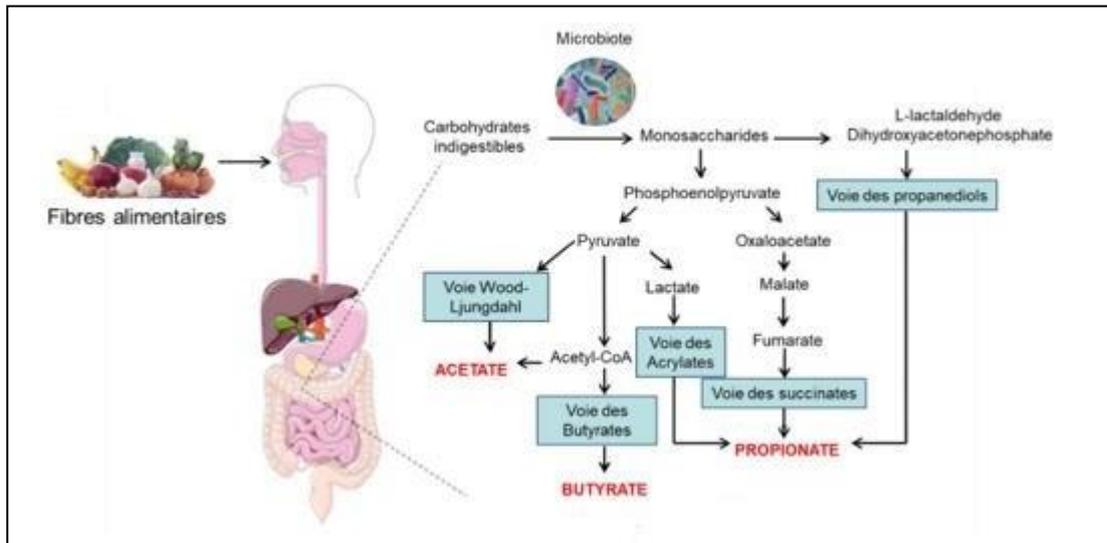


Figure 11 : Voies métaboliques principales du microbiote bactérien impliquées dans la génération des AGCC (Frampton *et al.*, 2020).

Ils sont produits par différents types de bactéries récapitulées de manière non exhaustive dans le tableau 8 (Venegas *et al.*, 2019). Ces AGCC bactériens ont de nombreux rôles dans l'homéostasie intestinale (Canfora *et al.*, 2015).

2Tableau 8 : Bactéries productrices et fonctionnalités des principaux AGCC (Venegas *et al.*, 2019).

		Bactéries productrices	Fonctions
AGCC	Acétate	Bifidobacterium Lactobacillus Akkermansia muciniphila Prevotella spp. Ruminococcus spp.	Régulation du pH Contrôle de l'appétit Protège des bactéries pathogènes Activité anti-inflammatoire
	Propionate	Bacteroidetes Firmicutes Lachnospiraceae	Contrôle de l'appétit Activité anti-inflammatoire Protège des bactéries pathogènes
	Butyrate	Faecalibacterium prausnitzii Eubacterium Roseburia spp.	Source d'énergie pour les cellules Activité anti-inflammatoire Activité cérébrale

II.4. Effets des probiotiques sur les maladies intestinales

Un grand nombre d'états pathologiques et de troubles intestinaux ont été liés à un déséquilibre du microbiote du tube digestif. Des preuves scientifiques confirment le rôle important que les probiotiques peuvent jouer dans le système digestif qui ont des effets significatifs sur l'atténuation des symptômes de plusieurs maladies (**Delzenne et al., 2021**).

1- Diarrhée infectieuse.

Parmi les différents micro-organismes qui provoquent des diarrhées infectieuses, le rotavirus est le cas le plus fréquent chez les nourrissons. La diarrhée aiguë est également fréquente chez les voyageurs, dans qui *Escherichia coli* entérotoxigène est particulièrement fréquent. D'autres agents pathogènes bactériens diarrhéiques importants sont membres des genres *Salmonella*, *Campylobacter* et *Shigella*. La justification de l'utilisation des probiotiques dans la diarrhée infectieuse est qu'ils agissent contre les pathogènes entériques en entrant en compétition pour les nutriments disponibles et les sites de liaison (**Fila et Jones, 2022**). La Société européenne de gastroentérologie, d'hépatologie et de nutrition pédiatrique (ESPGHAN) recommande d'envisager l'administration des probiotiques suivants, en plus de la réhydratation, comme traitement de la gastro-entérite aiguë chez l'enfant: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* et *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, bien que ce dernier ait une qualité de preuve très faible selon le rapport de l'ESPGHAN (**Turco et al., 2021**).

2- Diarrhée associée aux antibiotiques (DAA).

La thérapie antimicrobienne perturbe le microbiote endogène du tube digestif, ce qui entraîne fréquemment une diarrhée. Dans la majorité des cas, cette diarrhée est liée à la prolifération de *Clostridioides difficile*. Le nombre croissant d'études cliniques réalisées ces dernières années a fourni des données pour des méta-analyses testant l'efficacité des probiotiques (principalement la souche *Lactobacillus* GG et l'espèce de levure *S. boulardii*) dans la protection et la rechute contre *C. difficile* (**Manus, 2023**).

3- Maladie inflammatoire chroniques de l'intestin (MICI).

Les MICI comprennent la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse (CU) et la pouchite qui sont caractérisées par une dérégulation du système immunitaire conduisant à une inflammation du tube digestif (**Chevallier, 2021**).

4- Le syndrome du côlon irritable (SII).

Le SII se caractérise par un inconfort ou des douleurs abdominales et une altération de la fonction intestinale. Bien que les causes du SII ne soient pas complètement comprises, de plus en plus de preuves suggèrent un rôle potentiel du microbiote intestinal dans sa pathophysiologie et la génération de symptômes. Pour cela, différentes études d'intervention sur les probiotiques ont été réalisées ces dernières années et les résultats suggèrent que l'utilisation de probiotiques est bénéfique pour le soulagement des symptômes du SII (**Bruley des Varannes, 2021**).

5- L'infection à *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori, un agent pathogène très répandu, est une cause majeure de gastrite chronique et d'ulcères gastroduodénaux et un facteur de risque de malignités gastriques. Les études utilisant des probiotiques seuls n'ont pas permis d'éradiquer *H. pylori*. Cependant, plusieurs essais ont montré que si les probiotiques sont utilisés en conjonction avec le traitement médical standard, le taux d'éradication est amélioré (Abdelhamid *et al.*, 2023)

6- Allergie et intolérance alimentaires

Une grande partie de la population mondiale présente de faibles niveaux de l'enzyme - galactosidase (lactase) dans la muqueuse de l'intestin grêle et une sensibilité vis-à-vis les protéines alimentaires. Il existe de bonnes preuves scientifiques de l'atténuation des symptômes de cette sensibilité alimentaire par la consommation de yaourts et de produits laitiers fermentés contenant des bactéries lactiques classiques comme cultures de départ et des bactéries probiotiques (**El Mecherfi *et al.*, 2021**).

II.5. Le microbiome et la régulation de l'allergie alimentaire

Le microbiote possède un grand rôle dans l'établissement et la maturation des réponses immunitaires. Il peut agir de façon directe *via* les Récepteurs de reconnaissance de formes (Pattern Recognition Receptors PRR), ou indirecte *via* les AGCC. Récemment, le terme immunobiotique a été créé pour les souches probiotiques ayant un effet sur le système immunitaire (**Gao *et al.*, 2021**).

L'augmentation rapide de la prévalence des allergies alimentaires au cours des deux dernières décennies indique que les facteurs environnementaux modifient le risque d'incidence, et comprennent : le mode d'accouchement (risque élevé associé à l'accouchement par césarienne), l'exposition à des animaux domestiques ou à l'environnement agricole (protecteur),

le fait d'avoir des frères et des sœurs plus âgés (protecteur) et l'exposition à une garderie au début de la vie (protecteur). Ces facteurs sont associés à des modifications du microbiote intestinal, et peuvent donc, exercer une influence microbienne sur le système immunitaire des muqueuses. Il existe de plus en plus de preuves d'une dysbiose chez les patients souffrant d'une allergie alimentaire qui peut précéder l'apparition de la maladie (**Azad et al., 2015**). Des différences dans la composition microbienne ont également été liées à la résolution de l'allergie au lait (**Bunyavanich et al., 2016**). Les limites des études examinant l'association du microbiome avec l'allergie alimentaire à ce jour incluent la petite taille de l'échantillon et/ou l'utilisation de la sensibilisation ou de l'auto-évaluation comme mesure de l'allergie alimentaire (**Hirata et al., 2022**).

Plusieurs études de cohortes infantiles recensent la présence d'une dysbiose du microbiote intestinal chez les enfants allergiques alimentaires (**Berni Canani et al., 2016; Bunyavanich et al., 2016; Fazlollahi et al., 2018**). En effet, les nourrissons allergiques au lait de vache et aux œufs présentent une composition microbienne intestinale enrichie en *Lachnospiraceae* et les *Ruminococcaceae*, et diminuée en *Bifidobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Enterococcaceae* (**Berni Canani et al., 2016; Fazlollahi et al., 2018**). Bao et ses collègues identifient une différence de 64 unités taxonomiques opérationnelles (OTU), surtout des bactéries du genre *Clostridia*, entre des jumeaux adultes allergiques ou sains. Ils soulignent également que la présence de *Phascolarctobacterium faecium* et *Ruminococcus bromii* est associée à un état sain (**Bao et al., 2021**).

Les limites des études examinant l'association du microbiome avec l'allergie alimentaire à ce jour incluent la petite taille de l'échantillon et/ou l'utilisation de la sensibilisation ou de l'auto-évaluation comme mesure de l'allergie alimentaire. Bien que plusieurs études aient identifié des différences dans la composition microbienne entre l'allergie alimentaire et les témoins, il y a un manque d'informations sur la conséquence fonctionnelle des changements dans la composition microbienne. La dysbiose dans le contexte de l'asthme a été mécaniquement liée à la régulation immunitaire, démontrant clairement les changements induits par les microbes dans l'immunité innée ou adaptative qui sous-tendent le phénotype asthmatique (**Arrieta et al., 2015; Stein et al., 2016**). En outre, des souches bactériennes protectrices et des produits microbiens liés à la promotion des phénotypes de la maladie ont été identifiés avec de telles approches. L'établissement du profil fonctionnel du microbiome intestinal doit être mis en œuvre dans le domaine de l'allergie alimentaire.

Afin d'étudier le rôle de la colonisation microbienne sur le développement du système immunitaire, des modèles animaux axéniques et gnotoxéniques ont été mis au point. Ces modèles murins ont clairement démontré le potentiel du microbiote à réguler la sensibilisation aux aliments. Les souris traitées aux antibiotiques, les souris sans germe et celles dont le microbiote est peu diversifié sont sensibles aux allergies alimentaires (**Cahenzli et al., 2013 ; Stefka et al., 2014**). Les souris génétiquement sensibles à l'allergie alimentaire ont une signature microbienne intestinale significativement différente de celle des souris de type sauvage résistantes, et le transfert du microbiote à des souris sans germe transfère la sensibilité (**Noval Rivas et al., 2013**). Les espèces de Clostridia présentes dans le microbiote commensal ont été identifiées comme supprimant le développement de l'allergie à l'arachide (**Stefka et al., 2014**). Des espèces de Clostridia dérivées du microbiote de la souris ou de l'homme ont été identifiées comme régulatrices et supprimant le développement de l'allergie alimentaire lorsqu'elles sont administrées de manière thérapeutique à des souris (**Atkinson et al., 2014**). Administrées à des souris à des fins thérapeutiques. Ces données, à confirmer, mettent en évidence que le microbiote intestinal, et certaines souches en particulier, joue un rôle protecteur des allergies alimentaires (**Atarashi et al., 2011, 2013**).

II.6. Colonisation microbienne favorise la production d'IgA et cytokines

La colonisation microbienne favorise la production d'IgA par la signalisation MyD88 (protéine adaptatrice) dans les cellules Treg conduisant à la régulation des réponses des cellules T folliculaires (Tfh) de la muqueuse (**Wang et al., 2015**). Les IgA peuvent contribuer à la tolérance par l'exclusion des antigènes. La colonisation de souris sans germes avec des souches de Clostridia induit également la production d'IL-22 (**Stefka et al., 2014**), une cytokine qui protège l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et réduit la perméabilité intestinale aux antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal peut interagir avec d'autres facteurs environnementaux importants, tels que l'alimentation, pour supprimer le développement de l'allergie alimentaire. Les fibres alimentaires sont métabolisées par des bactéries anaérobies en acides gras à chaîne courte (AGCC), tels que le butyrate, le propionate et l'acétate. L'alimentation des souris avec un régime riche en fibres a supprimé le développement de l'allergie alimentaire. Les régimes riches en fibres ont induit la génération d'AGCC et la suppression de l'allergie alimentaire d'une manière dépendante du microbiote, et l'administration d'AGCC seule pouvait supprimer l'allergie alimentaire. Les changements immunitaires induits par un régime riche en fibres comprenaient une augmentation des cellules Tfh, une augmentation des IgA et une augmentation des cellules Treg et dépendaient de la

signalisation par les récepteurs des AGCS GPR43 sur les cellules épithéliales et GPR109A sur les cellules immunitaires (**Smith *et al.*, 2013 ; Tan *et al.*, 2016**).

II.7. L'allaitement : un facteur pour la suppression des allergies alimentaires

Le lait humain contribue directement à l'établissement du microbiote intestinal et facilite une symbiose entre ce microbiote et le nourrisson en fournissant des nutriments essentiels ; en particulier des glycanes du lait ou HMO pour le métabolisme microbien (**Sultan *et al.*, 2020 ; El-Mowafy *et al.*, 2021**).

Nanthakumar *et al.* (2016) ont proposé que le microbiote spécifique qui colonise l'intestin au début de la vie du nourrisson induise l'expression de la fucosyltransférase 2 des cellules épithéliales intestinales (CEI). Ceci entraîne la fucosylation de marqueurs de surface sur les cellules épithéliales gastro-intestinales, ce qui favorise la croissance des microbes fermentant le fucose. Les micro-organismes utilisent les glycosaminoglycanes, les glycoprotéines, les glycolipides et les oligosaccharides (glycanes du lait) disponibles comme prébiotiques pour faciliter leur croissance (**Newburg et He, 2015**).

Le microbiote intestinal limite la croissance des bactéries pathogènes par la compétition pour les nutriments et les récepteurs. Des microbes spécifiques facilitent la formation de la couche de mucus, le développement de la barrière et des structures lymphoïdes sous-muqueuses intestinales. Séparément, les HMO se lient aux molécules de surface des bactéries et des virus empêchant la liaison avec l'épithélium intestinal et semblent diminuer l'inflammation *via* des voies de signalisation (**Newburg et He, 2015**). **Newburg et Morelli (2015)** décrivent la symbiose du microbiote et le développement intestinal du nourrisson comme dépendant des HMO présents dans le lait maternel. Les microbes "commensaux", en particulier *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (**Lo Presti *et al.*, 2019 ; Ryan *et al.*, 2020 ; Mei *et al.*, 2021**), induisent la production de glycanes dans la muqueuse, ce qui favorise la croissance microbienne. **He *et al.* (2014)** décrivent deux HMO différents (3'-galactosyllactose et 2'-fucosyllactose) présents en grande quantité dans le colostrum. Ces HMO affectent les voies de signalisation des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes en diminuant la production de cytokines et la réponse inflammatoire.

Il existe même maintenant des essais cliniques examinant l'effet de probiotiques ajoutés au régime alimentaire de femmes allaitantes. Les résultats ont indiqué que les niveaux d'immunoglobuline A sécrétoire (sIgA) ont augmenté dans les selles du nourrisson et sur les

valeurs moyennes d'IL-6 dans le colostrum et sur les valeurs moyennes d'IL-10 et TGF- β 1 dans le lait maternel mature. Cela démontre la possibilité que des microbes potentiellement bénéfiques influencent le contenu du lait maternel de la femme et, par la suite, le tractus gastro-intestinal du nourrisson (figure 12) par le biais de facteurs bioactifs spécifiques qui atteignent le nourrisson. Le bénéfice final pour le nourrisson reste à étudier (**Baldassarre *et al.*, 2016 ; Baldassarre *et al.*, 2020**).

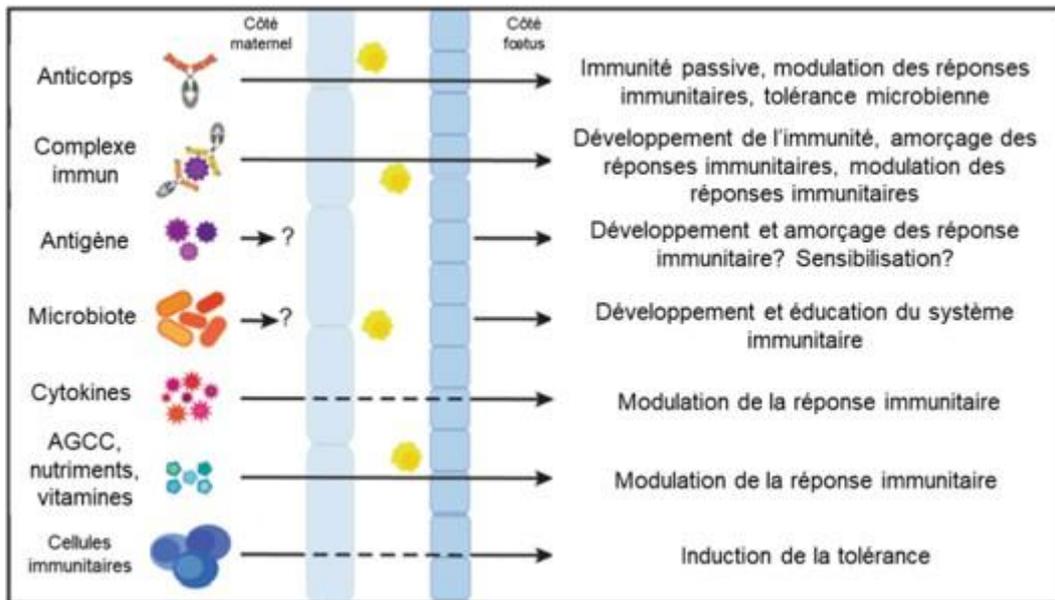


Figure 12 : Transfert foëto-maternel de facteurs immunitaires et autres molécules actives (**Jennewein *et al.*, 2017**).

Le lait maternel (figure 13) ne se contente pas seulement d'ajouter des bactéries supplémentaires à au microbiome intestinal du nourrisson, mais fournit à la fois des bactéries et des prébiotiques qui fonctionneront dans une relation symbiotique créant un milieu dans lequel l'immunité intestinale innée du nourrisson fonctionnera et son intestin se développera. L'influence de cette interaction symbiotique sur la santé future du nourrisson en ce qui concerne la protection immunitaire et la réactivité immunitaire (allergie ou maladie auto-immune) nécessitera des recherches approfondies impliquant non seulement la génomique, la métabolomique, la protéomique et la glycomique, mais aussi l'épigénétique et des techniques très pointues qui restent à développer. En notant aussi que le butyrate résulte de fermentation du glycanes indigestes du lait est connu pour réduire l'inflammation en contribuant à l'intégrité de la barrière intestinale. **Magnusson *et al.* (2020)** ont comparé l'impact du butyrate sur le profil immunitaire intestinal de patients atteints d'une maladie inflammatoire. Ils ont constaté que le

butyrate avait un impact différent sur la régulation des gènes, entraînait plus fortement la régulation négative des gènes exprimés dans les voies inflammatoires chez les témoins non enflammés comparés à ceux chez des patients atteints de ces maladies.



Figure 13: Composition du lait humain.

Chapitre III : Le rôle des bactéries
probiotiques (SL42 et *L. reuteri* DSM
17938) du lait humain dans l'allergie
alimentaire induite par la caséine
bovine: cas du rat Wistar en âge
juvénile.

Chapitre III : Le rôle des bactéries probiotiques (SL42 et *L. reuteri* DSM 17938) du lait humain dans l'allergie alimentaire induite par la caséine bovine: cas du rat Wistar en âge juvénile.

III.1. Introduction

Les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes dans le monde, en particulier dans les pays développés, mais elles sont également en augmentation dans le monde entier. Elles ne sont plus rares en Afrique où les allergies alimentaires représentent 5 à près de 50 % des réactions allergiques (**Gray et Souiki, 2017**). En Algérie et selon **Yakhlef et Souiki (2021)**, les allergies alimentaires touchent 8,5% des enfants scolarisés.

L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) est un type d'allergie alimentaire qui touche le plus souvent les nourrissons et les enfants de moins de trois ans. Les symptômes les plus courants sont la dermatite, l'urticaire ou le syndrome d'allergie orale, mais aussi des troubles gastro-intestinaux tels que : des changements dans la fréquence et la consistance des selles, des taches de mucus ou de sang dans les selles, des coliques infantiles, des nausées, des vomissements et un reflux gastro-œsophagien (**Luyt et al., 2014**). L'APLV touche environ 8 % des nourrissons et des jeunes enfants. Après les œufs, les arachides et le poisson, c'est la quatrième allergie alimentaire la plus fréquente chez les bébés.

Divers facteurs peuvent jouer un rôle dans le développement complexe des allergies alimentaires. Une perturbation du développement de la tolérance orale a été observée chez les nourrissons souffrant d'allergies alimentaires, caractérisée par des défauts dans l'induction des cellules T régulatrices et la production d'anticorps IgA neutralisants spécifiques de l'allergène. En outre, même si nous savons que les propriétés spécifiques des allergènes eux-mêmes contribuent au degré d'allergénicité, on pense que des défauts de la barrière épithéliale, tant au niveau de la peau que de l'intestin, ainsi que des modifications du pH de l'estomac, favorisent l'allergie. En outre, nous commençons à peine à comprendre comment le microbiome peut contribuer au problème de l'allergie (**Abdel-gadir et al., 2019 ; Lweala et al., 2017**).

L'allaitement maternel est indéniablement bénéfique selon les preuves scientifiques. Le lait maternel est le seul lait qui peut être adapté en permanence aux besoins d'un enfant en pleine croissance. L'un des avantages de l'allaitement est qu'il contribue à la prévention des allergies (**Zamanillo-campos et al., 2019**). Cependant, si un grand nombre d'études confirment le rôle

de l'allaitement dans la réduction du risque d'allergie, d'autres études portant sur l'effet d'un allaitement prolongé ne le confirment pas. Les modèles animaux et les données *in vitro* indiquent que le microbiome intestinal peut protéger contre les allergies alimentaires et que les probiotiques peuvent être un outil utile (Feehley *et al.*, 2019). Cependant, il n'existe pas de données cohérentes permettant d'identifier l'espèce spécifique, le dosage et la durée optimale pour obtenir l'immunomodulation souhaitée (Wesemann et Nagler, 2016). La supplémentation en probiotiques au début de la vie par le lait maternel peut être une approche utile pour la prévention primaire d'une variété de maladies allergiques humaines.

Le lait maternel de femmes en bonne santé contient environ 10^3 à 10^4 UFC/mL de microbes commensaux et constitue une source de probiotiques pour les nourrissons (Łubiech, et Twarużek, 2020). La diversité du microbiote du lait maternel est influencée par des facteurs maternels et environnementaux tels que la pratique de l'allaitement, le comportement, les autres composants du lait, la génétique, les régions géographiques, les races et les populations (Anjum *et al.*, 2020). La question de savoir si les probiotiques peuvent induire une tolérance dans les cas d'allergie alimentaire n'est pas encore clairement établie. À notre connaissance, les études publiées sur le potentiel anti-allergique alimentaire des bactéries probiotiques sont très variables (Torii *et al.*, 2007 ; An *et al.*, 2022) et aucune n'a utilisé de souches probiotiques issues du lait humain.

Dans la présente étude et afin d'évaluer les effets préventifs d'une intervention diététique avec des bactéries probiotiques, une tentative a été faite pour clarifier l'utilité de l'administration de bactéries probiotiques issues du lait humain dans la gestion des symptômes d'allergie alimentaire à l'âge juvénile. *Lactobacillus reuteri Protectis* (DSM 17938) ou le SL42 isolé ont été administrés à des rats Wistar femelles et juvéniles en tant que modèle animal sensibilisé à la caséine du lait de vache par voie intra-gastrique (i.g). Avant la partie *in vivo*, des caractérisations génétiques et probiotiques de la souche isolée SL42 ont été réalisées.

III.2. Matériels et méthodes

III.2.1. Souches utilisées

Lactobacillus reuteri Protectis (DSM 17938) : est la souche de référence provenant du lait maternel fournie par le laboratoire PEDIACT BioGaia (France).

SL42 : est la souche isolée du lait maternel d'une jeune mère en bonne santé (en 2018 au niveau du laboratoire LMBAFS).

Chaque souche a été cultivée dans le bouillon de Man Rogosa et Sharpe supplémenté en cystéine (MRS-cys) dans des boîtes avec des générateurs et indicateurs d'anaérobiose, à 37°C pendant 24 heures (3 répétitions successives).

III.2.2. L'identification du *SL42* par séquençage partiel des gènes 16S rRNA

L'extraction de l'ADN génomique bactérien a été réalisée à l'aide du kit d'extraction d'acide nucléique GF-1 (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaisie) conformément aux instructions du fabricant. La région complète du gène de l'ARNr 16s a été amplifiée à l'aide des amorces 1492R (5'-GGTTACCTTGACGACTT-3') et 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaisie). Les produits PCR sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % et soumis au séquençage du gène de l'ARNr 16S (Seri Kembangan, Selangor, Malaisie ; <https://apicalscientific.com/>). L'identification de l'isolat a été réalisée par comparaison avec des séquences de référence à l'aide de l'algorithme NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). La méthode d'assemblage des voisins a été utilisée pour construire un arbre phylogénétique (programme MEGA 6.0).

III.2.3. Caractérisation du potentiel probiotique

Pour pouvoir la qualification de "probiotique" à la souche *SL42*, une série de tests a été réalisée pour les deux souches bactériennes utilisées dans la partie *in vivo* de cette étude, où l'isolat *SL42* a été comparé à la souche probiotique DSM 17938 prise comme référence. Les charges bactériennes ont été ajustées entre 1 et 5×10^7 UFC/mL dans toutes les expériences. La majorité des composants microbiologiques ont été achetés chez Merck et les produits chimiques chez Sigma (France).

III.2.3.1 Tests de pH et de tolérance biliaire

Le protocole de **Ziar *et al.* (2014)** a été suivi avec une légère modification. Les bactéries ont été cultivées (individuellement) dans des bouillons MRS de pH 2 et incubées à 37 °C pendant 2 h. Des boîtes de gélose MRS-cys ont été utilisées pour déterminer le nombre de bactéries viables toutes les 30 minutes d'exposition.

La tolérance des bactéries aux sels biliaires a été déterminée par la méthode de dénombrement des bactéries viables décrite **Voulgari *et al.* (2010)**. Après une incubation de 24 h à 37 °C, la culture a été centrifugée à $5000 \times g$ à 40 °C pendant 10 min. Enfin, 0,02 ml de suspension bactérienne a été inoculé dans un tampon phosphate fraîchement stérilisé de pH 7,5

contenant de la bile (0,3 % v/v ; Merck, France). Après incubation à 37 °C pendant 24 h, des numérations viables ont été observées sur des plaques de gélose MRScys.

III.2.3.2. Détection de l'activité antimicrobienne

Les deux souches probiotiques (*SL42* et *L.reuteri DSM 17938*) ont été testées pour leur activité antimicrobienne. Sept bactéries indicatrices pathogènes et un champignon, *Candida albicans*, ont été utilisés. Les bactéries probiotiques ont été cultivées séparément dans un milieu MRS-cys pendant 24 h à 37 °C, puis centrifugées à 8000× g pendant 15 min à 4 °C (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), et le surnageant acellulaire a été obtenu avant l'essai. Le pH a été ajusté à 6,5 avec 6 mol/L NaOH, puis filtré via une membrane avec une taille de pore de 0,22 µm. La méthode modifiée de la double plaque de la cupule d'Oxford a été utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne (Voulgari *et al.*, 2010). La cupule d'Oxford (5 mm) a été placée sur une surface d'agar et l'indicateur pathogène en phase exponentielle (100 µL, 1 × 10⁷ UFC/mL) a été étalé sur la surface de l'agar nutritive. Ensuite, 200 µL de surnageant ont été ajoutés dans les puits. Après une incubation à 30 °C pendant 24 h, les diamètres de la zone inhibitrice claire ont été mesurés.

Tableau 9 : Les souches pathogènes utilisées

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérotype <i>Enteritidis</i> ATCC 4931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>Shigella</i> sp. (isolat de notre collection)

III.2.3.3. Hydrophobicité

L'hydrophobicité des bactéries a été déterminée par extraction au xylène selon la méthode de **Perez *et al.* (1998)**, et le pourcentage d'hydrophobicité (H %) a été calculé à l'aide de l'équation :

$$H\% = [(A_0 - A)/A_0] 100$$

A₀ : la valeur d'absorbance mesurées avant l'extraction au xylène.

A : la valeur d'absorbance mesurées après l'extraction au xylène.

III.2.3.4. Activité hémolytique

Les cultures bactériennes ont été observées sur du sang de mouton défibriné à une concentration de 5 % (p/v) dans des boîtes de gélose au sang (**Buxton *et al.*, 2019**), incubées pendant 24 h à 48 °C. L'activité hémolytique a été vérifiée par les réactions de β-hémolyse (zones claires autour des colonies), α-hémolyse (zones vertes autour des colonies) et γ-hémolyse (aucune zone autour des colonies).

III.2.3.5. Assimilation du cholestérol

Selon la méthode de **Ziar *et al.* (2020)**, le milieu MRS-THIO contenant 2 % (p/v) de thioglycolate de sodium a été enrichi par 85 µg/mL de cholestérol soluble dans l'eau, préalablement stérilisé par filtration sur une membrane Millipore (C1145, cholestérol-PEG 600 ; Sigma). La bile à une concentration finale de 0,3 % et l'inoculum bactérien (1 %, p/v) ont ensuite été ajoutés. Le milieu a été incubé à 37 °C/24 h en conditions anaérobies (jarre anaérobie avec système de génération de CO₂, Anaerocult). Pour estimer la quantité de cholestérol assimilé, les cultures ont été centrifugées (2000× g /10 min à 4 °C) après 24 h d'incubation, et les culots ont été lavés avec de l'eau distillée stérile, et séchés à 80 °C jusqu'à ce que le poids reste stable. Les bactéries ont été testées pour leur capacité d'adsorption du cholestérol, exprimée par la capacité spécifique à réduire le cholestérol disponible dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation, qui a été calculée selon la formule proposée par **Pereira et Gibson(2003)**.

$$\text{Cholestérol (mg. g}^{-1}\text{)} = [B - T] / W$$

Où : B : La quantité de cholestérol dans le milieu témoin en mg.

T : La quantité de cholestérol dans le milieu de culture en mg.

W : Le poids sec des cellules après 24 ou 48 h d'incubation en g.

III.2.3.6. Sensibilité aux antibiotiques

Des cultures fraîches d'une nuit des deux bactéries probiotiques ont été inoculées séparément à 0,5 McFarland dans la gélose Mueller-Hinton. Par la suite, des disques d'antibiotiques ont été ajoutés aux géloses Mueller-Hinton inoculées. Les diamètres des zones d'inhibition autour des disques antibiotiques ont été observés après une période d'incubation de 24 à 48 heures à 37 °C. Les conditions de sensibilité ont été déterminées conformément aux normes du NCLS (**Plessas et al., 2017**).

Liste des antibiotiques utilisés : amoxicilline, pénicilline, gentamicine, streptomycine, chloramphénicol, norfloxacine, ciprofloxacine, sulfonamide, clindamycine, novobiocine et vancomycine.

III.2.4. Étude *in vivo*

III.2.4.1. Hébergement des animaux

Des rats Wistar femelles ont été achetés de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie) à l'âge de 6 semaines (80 - 100 g). Les salles d'hébergement ont été maintenues à une température constante (24 ± 2 °C) avec un cycle lumière/obscurité adéquat (12h :12h).

Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique sur les expérimentations animales de LMBAFS (université de Mostaganem). Les rats parentaux ont été logés par paires dans des cages en polycarbonate avec un accès *ad libitum* à de l'eau stérilisée et ont été nourris avec un diète sans allergènes (SARL Aliment souris et rat : La Ration, Bouzaréah, Alger, Algérie) pendant trois générations successives. La troisième génération a été utilisée dans cette expérience à l'âge juvénile et les rats ont été acclimatés dans les mêmes conditions (2 rats/cage) citées ci-dessus pendant 15 jours avant le début de la provocation à la caséine.

III.2.4.2. Conception expérimentale *in-vivo*

L'expérience *in vivo* suivie est illustrée dans **la figure 14**. Les rats femelles âgés de 3 semaines ont été répartis au hasard en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin (C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42, groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938, groupe sensibilisé à la caséine (CAS, Profifar©, 90% caséine de lait de vache, EAN 8712400748124, NUTRICIA Nutrition Clinique, Rueil-Malmaison Cedex, France), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 19738 (CAS+ DSM 19738).

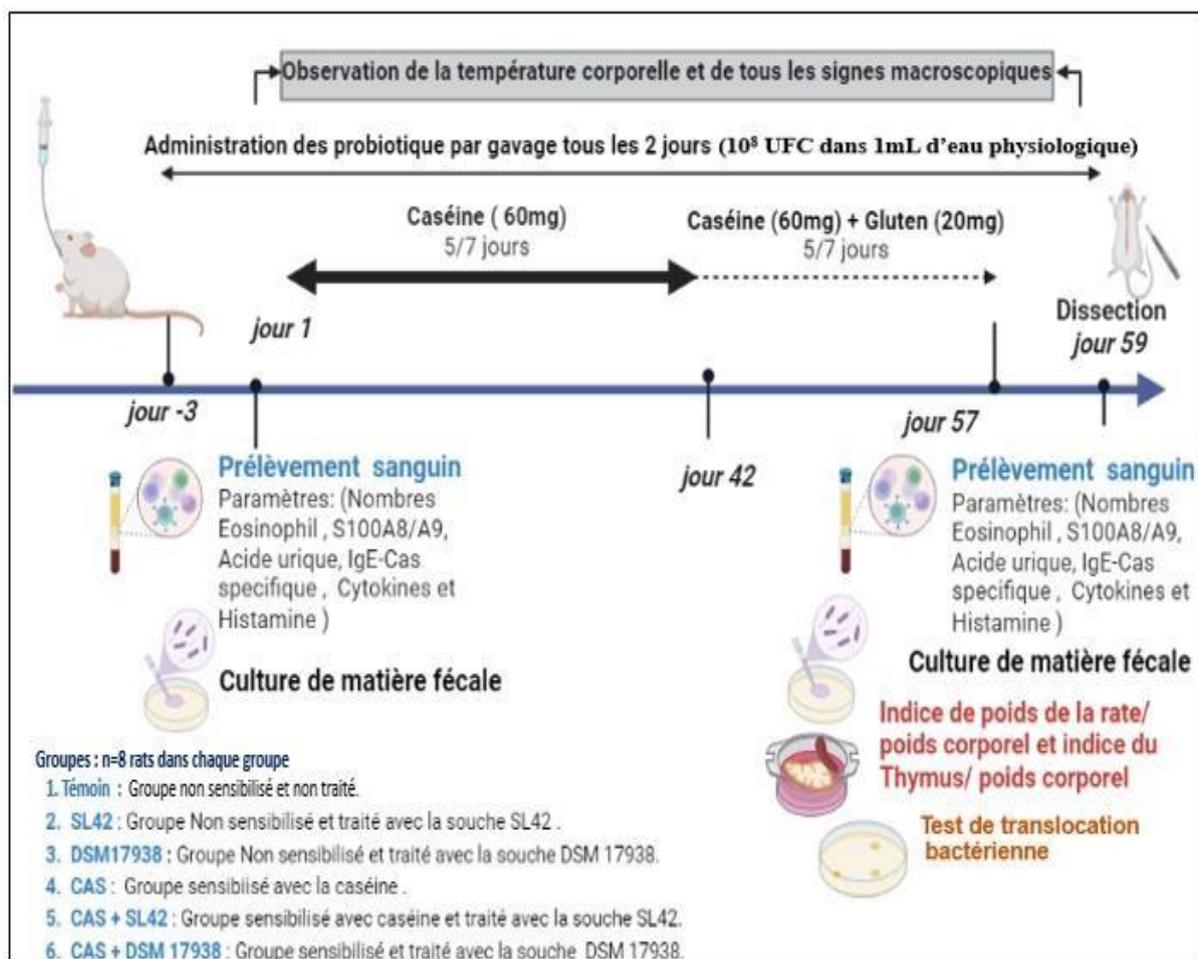


Figure 14 : Schéma expérimental et groupes de rats examinés dans le cadre de la présente étude. La caséine bovine (Protifar©) a été utilisée comme allergène et administrée par voie intra-gastrique sans adjuvant à des rats. 48 rats femelles (âgés de 3 semaines) ont été répartis en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 1938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 19738 (groupe CAS+DSM 19738). Dans tous les groupes de rats traités aux bactéries, le SL42 ou le DSM 17938 ont été administrés par gavage 1/2 jour du jour -3 au jour 58.

Avant (-3 jours) et pendant la provocation à la caséine, chaque rat des groupes traités aux probiotiques a reçu par gavage (1/2 jours) 10^8 UFC de DSM 19738 ou SL42 dans 1 mL d'eau physiologique par gavage. La provocation à la caséine a commencé par l'administration intragastrique de 60 mg de caséine sans adjuvant pendant les 42 premiers jours, puis a été associée à 20 mg de gluten pendant le reste de la période de challenge (43-57 jours). Ensuite, la sensibilisation à la caséine de lait de vache a été interrompue pendant un jour avant le sacrifice.

III.2.5. Évaluation des symptômes macroscopiques d'allergie à la caséine

Les symptômes macroscopiques d'allergie à la caséine ont été évalués en surveillant les rattes toutes les 30 minutes et pendant les 3 heures suivant la sensibilisation à la caséine. Les signes cliniques d'anaphylaxie ont été numérotés en fonction de la gravité du symptôme développé : 0 aucun signe ; 1 grattage et frottement du nez et de la tête ; 2 poches autour des yeux et de la bouche ; 3 diarrhée ; 4 activité réduite avec un rythme respiratoire satisfait ; cyanose autour de la bouche et de la queue ; pas d'activité et 5 mort.

La diarrhée a été classée selon l'échelle de Bristol : 1 grumeaux durs séparés, 2 fèces grumeleuses, 3 en forme de saucisse avec des fissures à la surface, 4 forme lisse et molle, 5 grumeaux mous avec des bords nets, 6 pâteux avec des bords déchiquetés et 7 entièrement liquide.

Le poids des rats a été enregistré pendant l'expérience afin d'évaluer l'effet de la sensibilisation induite par la CAS sur le poids corporel. La température rectale a été mesurée après la sensibilisation à la caséine et toutes les 30 minutes qui suivent (sonde RET-2, Kent Scientific, USA). L'état de stress des rats a été estimé en mesurant la concentration sérique d'acide urique par fluorométrie (MAK077-1KT, Sigma-Aldrich, France).

III.2.6. Détermination des CAS-IgE spécifiques, de l'histamine, de S100A8/A9, des cytokines associées à l'inflammation et du nombre d'éosinophiles

Les niveaux de S100A8/A9, TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-6 et IL-1 β dans le sang ont été déterminés par ELISA Assay Kit conformément aux instructions du fabricant (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Le sérum a été prélevé 30 minutes après l'administration de la caséine et a été testé pour le taux d'histamine sérique à l'aide d'un kit ELISA conformément aux instructions du fabricant (Beckman Coulter, Brea, CA). Les taux sériques d'IgE spécifiques à la caséine ont également été évalués à l'aide d'un kit ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA).

Le nombre d'éosinophiles dans le sang a été déterminé par la technique de l'hémogramme (Mindray 2800 BC brand automatic blood count device, UK).

III.2.7. Culture de bactéries à partir de matières fécales

Des échantillons de matières fécales ont été prélevés avant et après l'épreuve etensemencés sur Hektoen/TSA pour le dénombrement des bactéries non spécifiques et sur des milieux MRS/MRS-cys pour le dénombrement des bactéries lactiques (**Huang *et al.*, 2012**). Après 48 à 72 heures d'incubation, les charges bactériennes ont été exprimées en UFC/g de matière fécale. Les espèces de *Clostridium* ont été dénombrées après un enrichissement initial suivi d'un ensemencement sur TSA II (4 jours) avec 5 % de sang de mouton (Fisher scientific, CA) (**Hink *et al.*, 2013**).

III.2.8. Détermination de l'indice poids de la rate/poids corporel et de l'indice poids du thymus/poids corporel

Les rats ont été pesés et sacrifiés. La rate et le thymus des rats ont été prélevés et pesés immédiatement. L'indice de la rate (SI) et l'indice du thymus (TI) ont été calculés à l'aide de l'équation suivante (**Song *et al.*, 2017**) :

$$RI \text{ ou } TI \left(\frac{mg}{g} \right) = (\text{poids de la rate ou du thymus}) / \text{poids corporel}.$$

III.2.9. Analyse histologique

Les tissus intestinaux (la partie jéjunale de l'intestin) ont été prélevés le jour de la dissection, fixés dans du formol tamponné au phosphate à 10 % et inclus dans de la paraffine. Les sections de jéjunum ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour observer les infiltrats inflammatoires, les éosinophiles et pour identifier les cellules calciformes.

III.2.10. Test de translocation bactérienne

La rate et le MLN de rats gavés ou non avec des bactéries probiotiques ont été macérés et mis en suspension dans une solution d'eau physiologique stérile. Une série de dilutions a été ensemencée et incubée pendant une nuit à 37 °C sur des géloses MacConkey (24 h), Blood agar et MRS-cys agar (48 h) (Merck, France).

III.2.11. Analyse statistique

La moyenne \pm l'écart-type a été utilisée pour présenter les données de chaque expérience en vue de la mise en œuvre de l'analyse statistique. (SPSS statistics 26, USA). La signification statistique a été déterminée par le test t Student, Les différences à $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

III.3. Résultats

III.3.1. L'analyse de l'ARNr 16S de SL42

Après la catalase (négative), les tests de Gram (positif), les analyses morphologiques (des colonies blanches et lisses d'environ 2 mm de diamètre ont été prélevées sur la gélose MRS-cys) et biochimiques, la souche SL42 a été mise en culture à 37 °C afin d'obtenir des cultures pures pour l'identification moléculaire.

La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche SL42 a été séquencée et comparée à des souches connues sur la base de recherches BLAST. SL42 a ensuite été identifiée comme *Lacticaseibacillus rhamnosus*, comme le confirment les résultats de l'analyse phylogénétique (**figure 15**).

III.3.2. Potentialité probiotique de *L. rhamnosus* SL42

L. rhamnosus SL42 a montré une tolérance élevée à l'acidité où une capacité de survie de 93 % a été calculée après 2 heures à pH 2. De plus, environ 90,5 % des cellules de *L. rhamnosus* SL42 ont survécu à la bile à 0,3 % et ont assimilé 6,01 mg/g de cholestérol. La souche isolée *L. rhamnosus* SL42 a également montré une hydrophobie élevée de 51 % (**tableau 10**).

Les cellules de *L. rhamnosus* SL42 ont fortement inhibé *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, les zones d'inhibition les plus élevées étant respectivement de 18 et 17 mm. Les inhibitions de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* étaient plus faibles, avec des zones d'inhibition comprises entre 11 et 15 mm (**tableau 11**).

L. rhamnosus SL42 présentait une sensibilité variable aux antibiotiques (5/11). Elle est sensible à la pénicilline, à l'amoxicilline, au chloramphénicol, à la novobiocine et à la norfloxacin (**tableau 12**). Cependant, la souche s'est révélée résistante à la gentamicine, aux sulfamides et à la vancomycine (de même que *L. reuteri* DSM 17938).

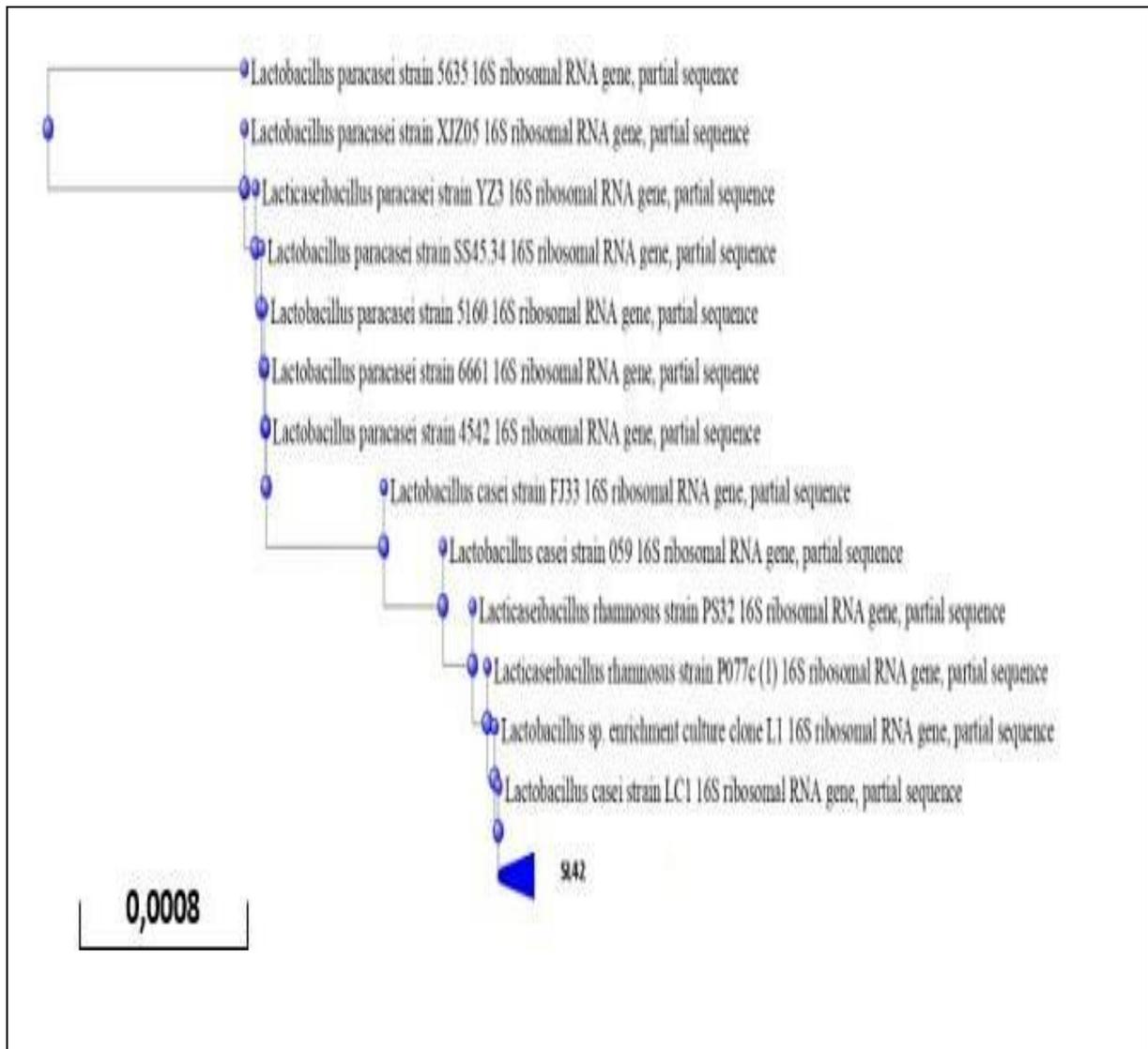


Figure 15 : Arbre phylogénétique construit montrant la position du SL42 isolé avec les espèces de *Lactobacillus* apparentées.

Tableau 10 : Caractéristiques probiotiques de la souche SL42 comparées à *L. reuteri* DSM 17938.

	<i>L. rhamnosus</i> SL42	<i>L. reuteri</i> DSM 17938
Paramètres	Viabilité en terme de biomasse	
Résistance à l'acidité (pH = 2)	2×10^7 UFC /mL (0 min)	5×10^7 UFC /mL (0 min)
	7.5×10^6 UFC /mL (30 min)	2.3×10^7 UFC /mL (30 min)
	6.9×10^6 UFC / mL (60 min)	1.9×10^6 UFC /mL (60 min)
	6.6×10^6 UFC /mL (120 min)	1.2×10^6 UFC /mL (120 min)
La survie en présence de la bile (0.3 %)	5×10^7 UFC/mL (0 min)	2.3×10^7 UFC /mL (0 min)
	1.4×10^7 UFC /mL (4 h)	2.1×10^6 UFC /mL (4 h)
	9.3×10^6 UFC /mL (24 h)	1.2×10^6 UFC /mL (24 h)
Assimilation du Cholestérol	6.01 mg/g	6.09 mg/g
Hydrophobicité (%)	51 %	76%
Activité hémolytique	γ - hémolytique (pas d'hémolyse)	γ - hémolytique (pas d'hémolyse)

*Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions indépendantes (n = 3).

Tableau 11 : Activité antimicrobienne* des bactéries probiotiques.

Pathogènes	Zone d'inhibition (mm)	
	<i>L. rhamnosus</i> SL42	<i>L. reuteri</i> DSM 17938
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14 ± 0.18	13 ± 0.36
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18 ± 0.02	14 ± 0.10
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	9 ± 0.11	6 ± 0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	15 ± 0.30	8 ± 0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	17 ± 0.22	15 ± 0.20
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype <i>Enteritidis</i> ATCC 4931	9 ± 0.08	16 ± 0.04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	11 ± 0.02	14 ± 0.20
<i>Shigella</i> sp. (isolat de notre collection)	5 ± 0.02	6 ± 0.10

*Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions indépendantes (n = 3) ± SD.

Tableau 12 : Sensibilité aux antibiotiques des bactéries probiotiques.

Bactéries probiotiques	Sensibilité aux antibiotiques (mm)											
	Amoxicillin (30 µg)	Ciprofloxacine (5 µg)	Gentamicin (10 µg)	Penicillin (10 µg)	Sulfonamide (25 µg)	Streptomycine (10 µg)	Clindamycine (2 µg)	Chloramphenicol (30 µg)	Vancomycine (30 µg)	Norfloxacine (10 µg)	Novobiocine (4 µg)	
<i>L. rhamnosus</i> SL42	15 ± 0.1 I	0 ± 0.01 R	10 ± 0.02 R	20 ± 0.01 S	0 ± 0.1 R	0 ± 0.1 R	0 ± 0.0 R	25 ± 0.1 S	8 ± 0.03 R	16 ± 0.1 I	22 ± 0.02 S	
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	0 ± 0.01 R	16 ± 0.02 I	8 ± 0.01 R	15 ± 0.01 I	0 ± 0.1 R	16 ± 0.1 I	18 ± 0.0 I	16 ± 0.1 I	12 ± 0.02 R	16 ± 0.1 I	22 ± 0.0 S	

Les résultats sont les moyennes de 3 répétitions indépendantes (n = 3) ±SD. Les abréviations sont : S, sensible ; I, intermédiaire ; R, résistant. La zone d'inhibition (mm) pour chaque antibiotique a été mesurée et interprétée comme suit : ≥19 mm = sensible (S) ; 15-18 mm = intermédiaire (I) ; ≤14 mm = résistant (R).

III.3.3. Les symptômes macroscopiques suivant le gavage à la caséine

La diarrhée n'a été observée qu'au cours de la première semaine de challenge et ce dès les 30 min premières suivant le gavage à la CAS. Le score diarrhéique était de 7 et 4 sur l'échelle de Bristole pour les rats recevant exclusivement du CAS (50 % des rats) ou des bactéries CAS-probiotiques (33 % des rats), respectivement. Les signes cliniques ont été qualifiés de 2 degrés pour le groupe CAS-rats même si la diarrhée s'est disparue après une semaine d'exposition.

En fait, il n'y a eu aucune différence de poids (**figure 16**) et de température (**tableau 13**) corporeux entre le groupe expérimental et le groupe témoin (tous les P >0,05) pendant toute la durée de l'étude.

Les taux d'acide urique dans le sérum ont augmenté de manière significative (tous P < 0,05) du 1^{ier} au 58^{ème} jour chez tous les rats sensibilisés à la caséine (49,8 % : CAS+SL42 ; 51,9 % : CAS+DSM 17938. 74,7 % : CAS) et sont restés inchangés dans le groupe témoin et ceux qui ont reçu individuellement les bactéries probiotiques seules (**figure 17**).

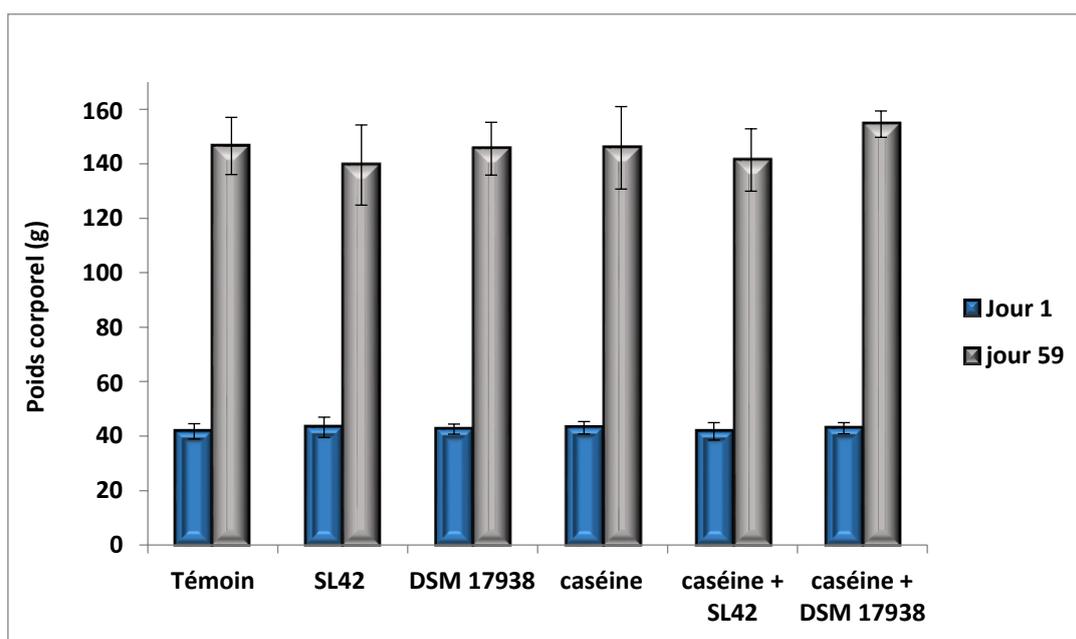


Figure 16: Variation du poids corporel (g) avant le 1^{er} jour et après 58 jours de challenge CAS. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Aucune différence significative n'a été observée à P > 0,05. Groupe non sensibilisé (groupe témoin), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS+DSM 17938).

Tableau 13 : Variation de la température corporelle (°C) pendant le challenge CAS.

	Témoin	SL42	DSM 17938	Casein	Casein + SL42	Casein + DSM17938
30 min	37 \pm 0.21	36 \pm 0.43	37 \pm 0.1	36.5 \pm 0.43	36 \pm 0.43	36 \pm 0.21
60 min	37 \pm 0.3	37 \pm 0.21	37 \pm 0.2	36 \pm 0.21	36 \pm 0.43	36 \pm 0.21
120 min	37 \pm 0.2	36.5 \pm 0.21	37 \pm 0.23	37 \pm 0.43	37 \pm 0.5	37 \pm 0.43

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Aucune différence significative n'a été observée à P > 0,05.

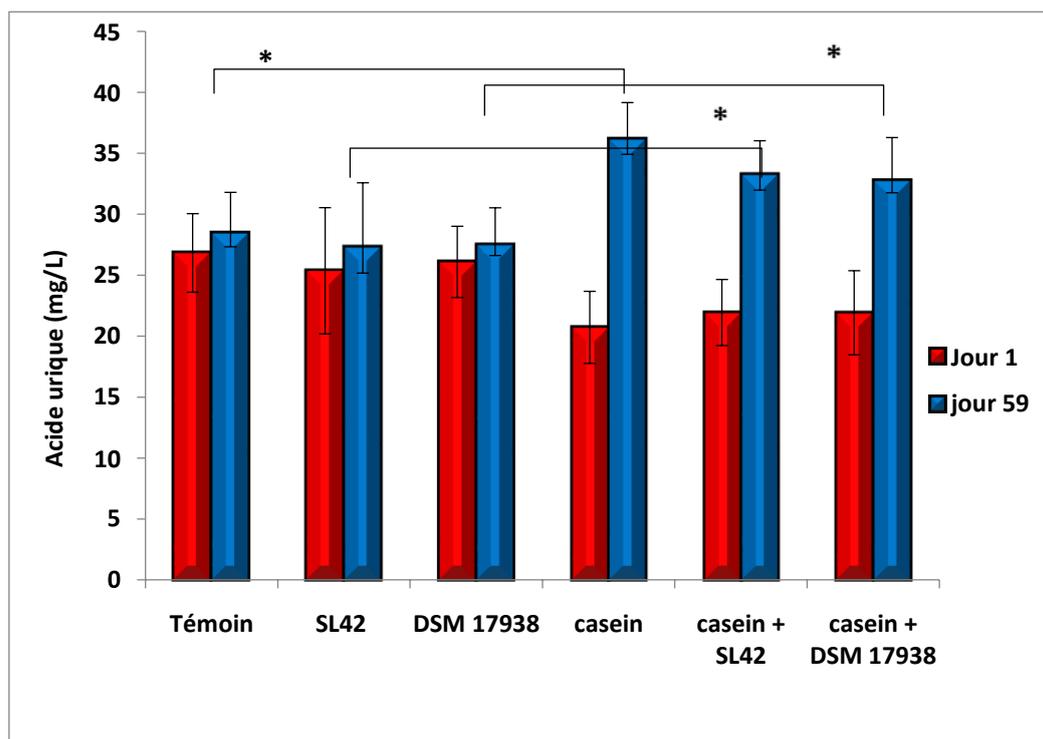


Figure 17 : Taux d'acide urique sérique (mg/L) enregistrés le 1^{er} jour et après 58^{ème} jour de provocation par la CAS. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). * Des différences significatives ont été observées à P < 0,05.

III.3.4. La calprotectine, les éosinophiles et les cytokines associées à l'allergie induite par la CAS

Des niveaux significativement plus élevés (P < 0,05) d'IgE spécifiques au CAS et d'histamine ont été détectés dans le sérum de tous les rats traités avec le CAS. La sensibilisation à la caséine déclenche la production d'IgE spécifiques avec une moyenne de $34,25 \pm 1,25$ (UI/L) chez les rats traités par CAS (**Figure 18a**). Les rats traités au CAS-probiotique ont présenté une réduction de près de 50 % (P < 0,05), les valeurs enregistrées étant de $15,89 \pm 0,89$ UI/L en moyenne dans le groupe traité au SL42, et de $17,98 \pm 0,53$ UI/L en moyenne dans le groupe traité au DSM 17938. Des tendances similaires ont été enregistrées pour les niveaux d'histamine (**Figure 18b**). Dans le groupe traité par CAS, nous avons enregistré en moyenne $25,6 \pm 1,6$ nmol/L (P < 0,05) par rapport à 19 ± 1 et $20,5 \pm 0,8$ nmol/L, notés respectivement chez les rats traités par SL4 et DSM 17938 (**Figure 18b**). Les groupes témoins ou ceux recevant uniquement des bactéries probiotiques individuelles n'ont pas produit d'IgE spécifiques au CAS ni d'histamine.

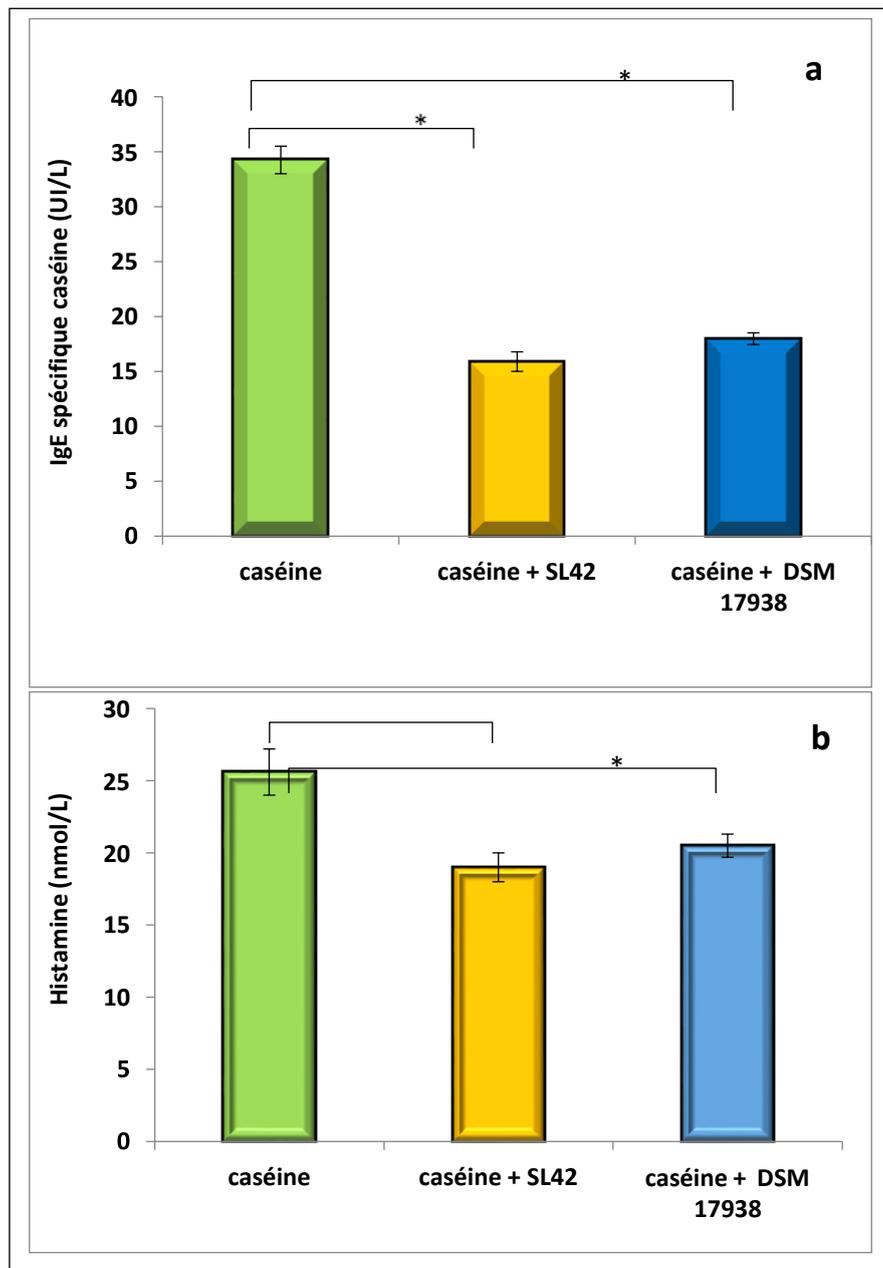
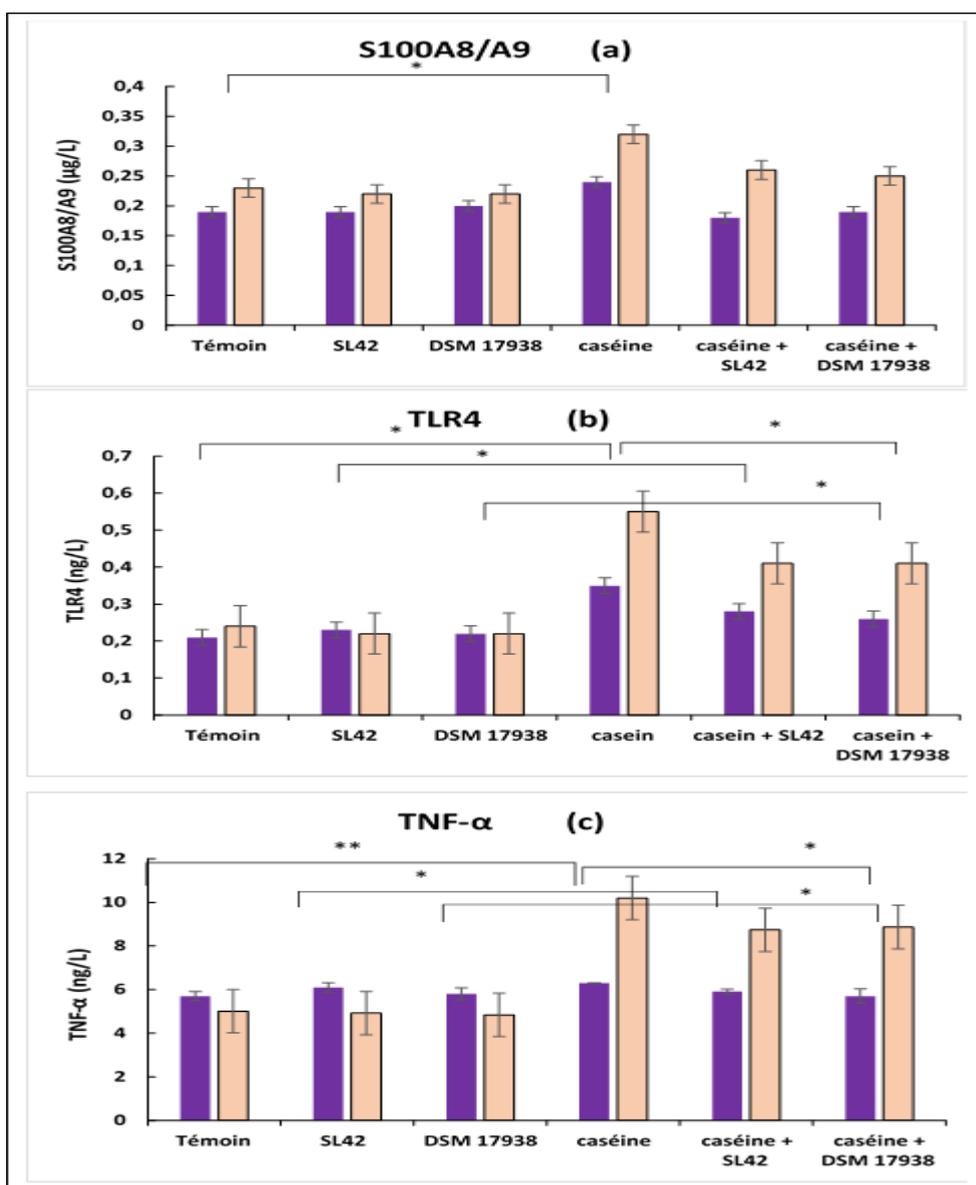


Figure 18 : Les niveaux d'IgE CAS (a) et d'histamine (b) dans le sérum ont été évalués par ELISA au jour de sacrifice (n = 8 rats/groupe). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * P < 0.05. Groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938).

Les niveaux plasmatiques de S100A8/A9 étaient élevés dans le groupe CAS par rapport au groupe témoin et aux groupes ayant reçu des probiotiques. Le niveau de S100A8/A9 était statistiquement différent avant et après 58 jours de challenge (tous P <0,05) comme le montre **la figure 19a**. Le SL42 a diminué la calprotectine (S100A8/9) de 18,7 % (rats traités par CAS+SL42).



(suite)

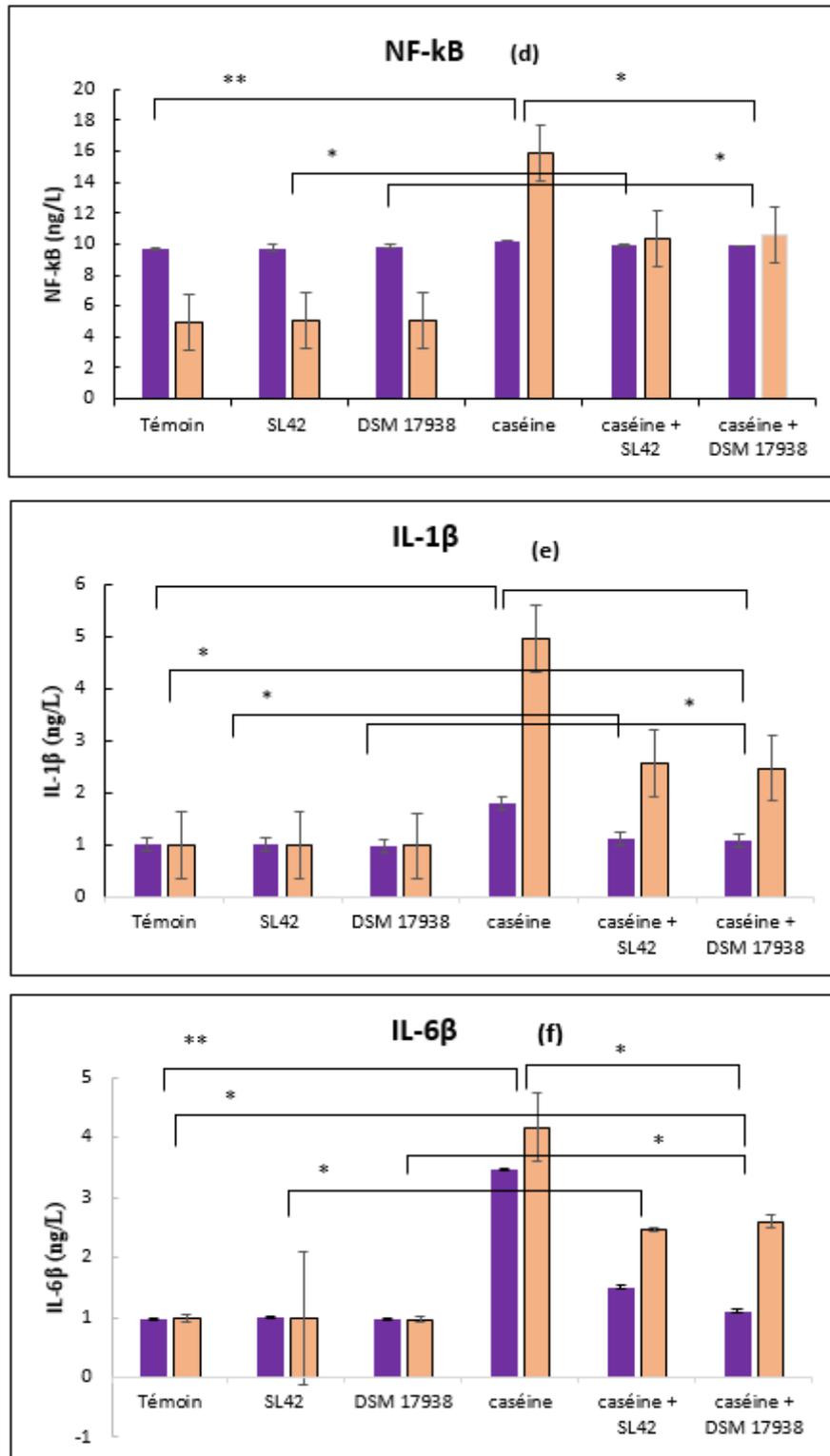


Figure 19 : Expression de S100A8/A9 et des cytokines associées chez les rattes Wistar sensibilisées par voie intra-gastrique de caséine sans adjuvant (avant 1^{er} jour, après 58^{ème} jour). Niveaux de S100A8/A9 (a), TLR4 (b), TNF-α (c), NF-κB (d), IL-1β (e) et IL-6 (f) dans le sérum des rattes de différents groupes. Les valeurs sont des moyennes ± SEM (n= 8 rats/groupe). * P < 0.05. ** P < 0.01. Groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938

(groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS), groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) et groupe sensibilisé à la caséine traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS++DSM 17938).

Les niveaux de TLR4 dans le groupe CAS étaient plus élevés que ceux du groupe témoin ou des groupes traités par probiotiques et des différences significatives ont été observées aux jours 1 et 59 (tous les $P < 0,05$), comme le montre **la figure 19b**. Le SL42 a réduit le TLR4 de 25,45 % chez les rats traités par CAS+SL42.

Les taux plasmatiques de TNF- α , NF- κ B, IL-1 β et IL-6 dans le groupe CAS étaient plus élevés que dans le groupe témoin. Des différences significatives ont été observées au jour 1 et au jour 59 (toutes $P < 0,05$), comme le montre **la figure 19c, d, e et f**, respectivement. Le SL42 a diminué les taux de TNF- α , NF- κ B, IL-1 β et IL-6 de -14,31 % à -48,58 % chez les rats traités par CAS+SL42.

De plus, le nombre d'éosinophiles a également augmenté avec une moyenne de $108,5 \pm 10,66$ /mm³ chez les rats sensibilisés au CAS sans traitement probiotique (**Figure 20**). L'administration de la souche SL42 a diminué le nombre à $90 \pm 1,41$ /mm³ (-16,67%), tandis que les rats traités avec la souche probiotique DSM17938 ont diminué le nombre d'éosinophiles à $93 \pm 7,03$ /mm³ (-13,88%). Les groupes recevant uniquement les bactéries probiotiques individuelles ont présenté des valeurs inférieures d'environ 50 %, allant de 51,25 à 52 /mm³ (**Figure 20**).

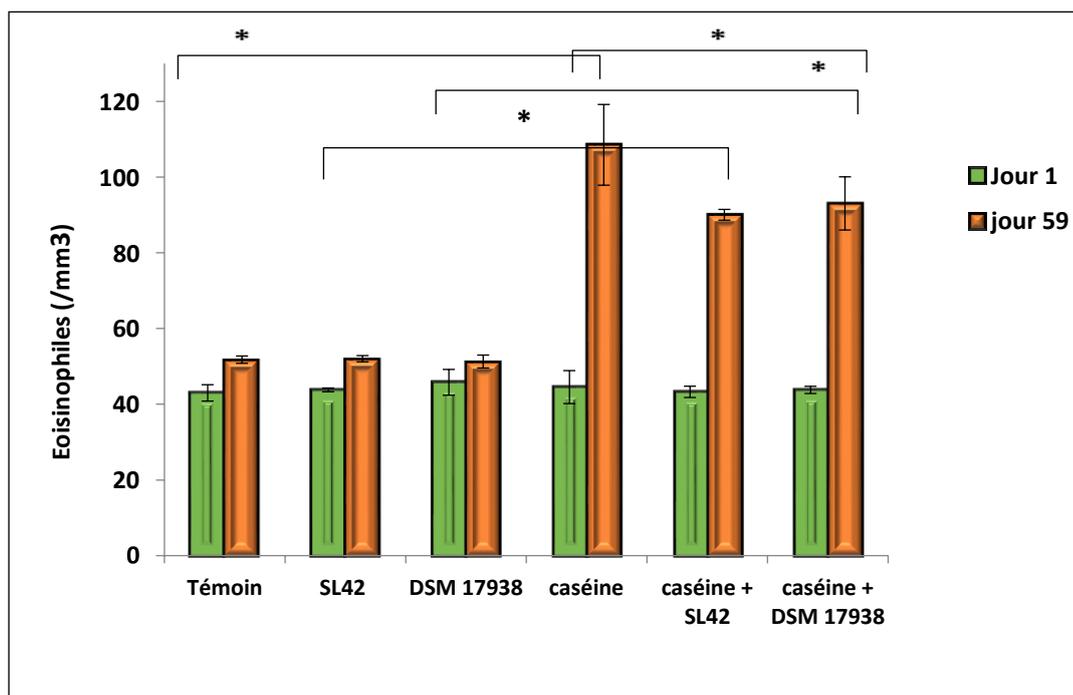


Figure 20: Nombre d'éosinophiles (/mm³) dans le sang déterminé par technique d'hémogramme chez les rattes Wistar (n = 8 rats/ groupe) sensibilisées par voie intra-gastrique de caséine sans adjuvant (avant 1^{er} jour, après 58^{ème} jour). Les valeurs sont des moyennes ± SEM. * P< 0.05.

III.3.5. Le dénombrement des bactéries fécales

La **figure 21 (a)** montre l'évolution de la densité des bactéries lactiques (LAB) et des bactéries non spécifiques avant et après le challenge CAS. Avant la sensibilisation, le profil bactérien était comparable ($P > 0,05$) entre les rattes du groupe témoin et celles du groupe CAS. L'administration de bactéries probiotiques a nettement augmenté la densité de LAB et celle des espèces de *Clostridia*, mais pas celle des bactéries non spécifiques (**Figure 21 b**).

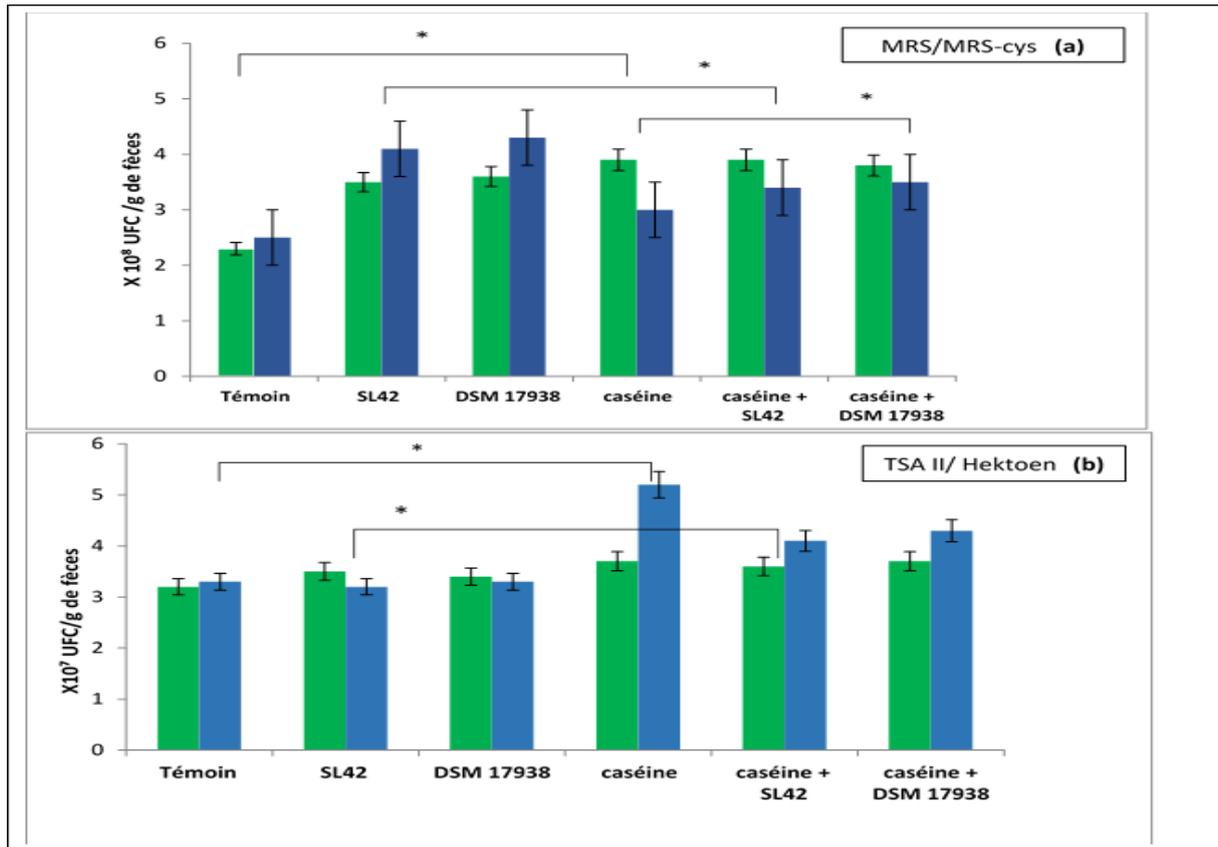


Figure 21 : Nombre de bactéries déterminé par la technique de l'ensemencement sur gélose sélective (n = 8 rats/groupe). Des rattes Wistar ont été sensibilisées par voie intra-gastrique par l'administration de caséine sans adjuvant. Les rattes ont été gavées 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 UFC/mL (les fèces ont été collectées au 59^{ème} jour). Le volume de la dose administrée était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution de PBS stérilisée. Les données MRS/MRS-cys : (a), TSA II/Hektoen : (b) sont présentées sous forme de moyenne \pm SM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * P < 0.05. Groupe non traité (groupe témoin) ; groupe non sensibilisé et traité avec la souche SL42 (groupe SL42) ; groupe non sensibilisé et traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938) ; groupe sensibilisé à la caséine (groupe CAS) ; groupe sensibilisé à la caséine et traité avec la souche SL42 (groupe CAS+SL42) ; et groupe sensibilisé à la caséine et traité avec la souche DSM 17938 (groupe CAS-+DSM 17938).

Après le 58^{ème} jour d'exposition à la CAS, les rats présentaient une densité réduite de LAB fécaux et une densité accrue de bactéries non spécifiques. Les altérations en nombre de bactéries entériques observées chez les rattes traitées par CAS ont été rétablies par l'administration de SL42 où les densités de LAB et de bactéries non spécifiques ont été significativement (P < 0,05) augmentée et diminuée, respectivement (**Figure 21 a, b**).

III.3.6. Poids de la rate et du thymus après utilisation de bactéries probiotiques

La **figure 22** montre les effets des deux souches probiotiques SL42 et DSM 17938 sur l'indice du thymus et de la rate des rats. Par rapport au groupe témoin, les indices du thymus et de la rate dans le groupe traité par le probiotique DSM17938 ont légèrement augmenté, tandis que ceux du groupe traité par la souche SL42 ont légèrement diminué, bien que les changements ne soient pas significatifs (tous les $P > 0,05$).

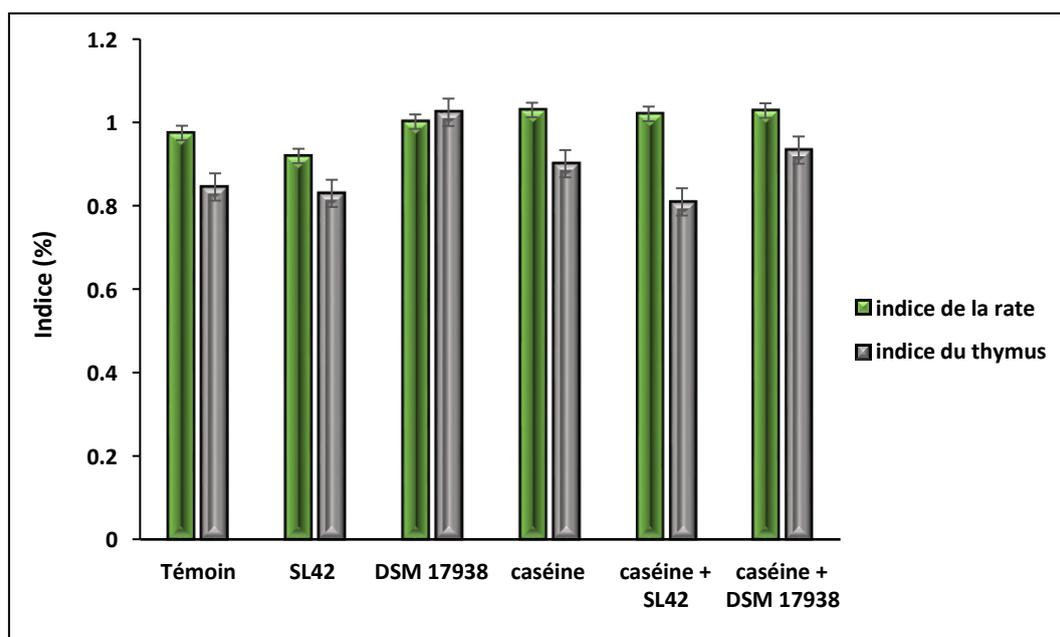


Figure 22 : Effets des bactéries probiotiques sur les indices du thymus et de la rate. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de caséine sans adjuvant. Les indices du thymus et de la rate ont été mesurés par le rapport entre le poids du thymus ou de la rate au poids corporel. Les valeurs sont des moyennes \pm SM (n= 8 rats/groupe). Aucune différence significative n'a été observée à $P > 0,05$.

III.3.7. L'inflammation du tissu jéjunal

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a montré que les muqueuses jéjunales étaient enflammées dans le groupe sensibilisé au CAS uniquement (**figure 23**). Le score d'inflammation histologique dans ce groupe était qualifié de 2 (léger à modéré), et l'infiltration d'éosinophiles a également augmenté de manière significative ($P < 0,05$) par rapport au groupe témoin (**figure 23**). En revanche, les scores d'inflammation intestinale et les degrés d'infiltration d'éosinophiles ont été significativement réduits par le traitement probiotique par rapport au

groupe sensibilisé au CAS (CAS uniquement). De plus, la longueur des villosités dans le groupe CAS seul a été significativement réduite ($P < 0,05$), bien que les groupes traités aux probiotiques aient montré des caractéristiques presque normales (**Figure 23**) similaires à celles des témoins.

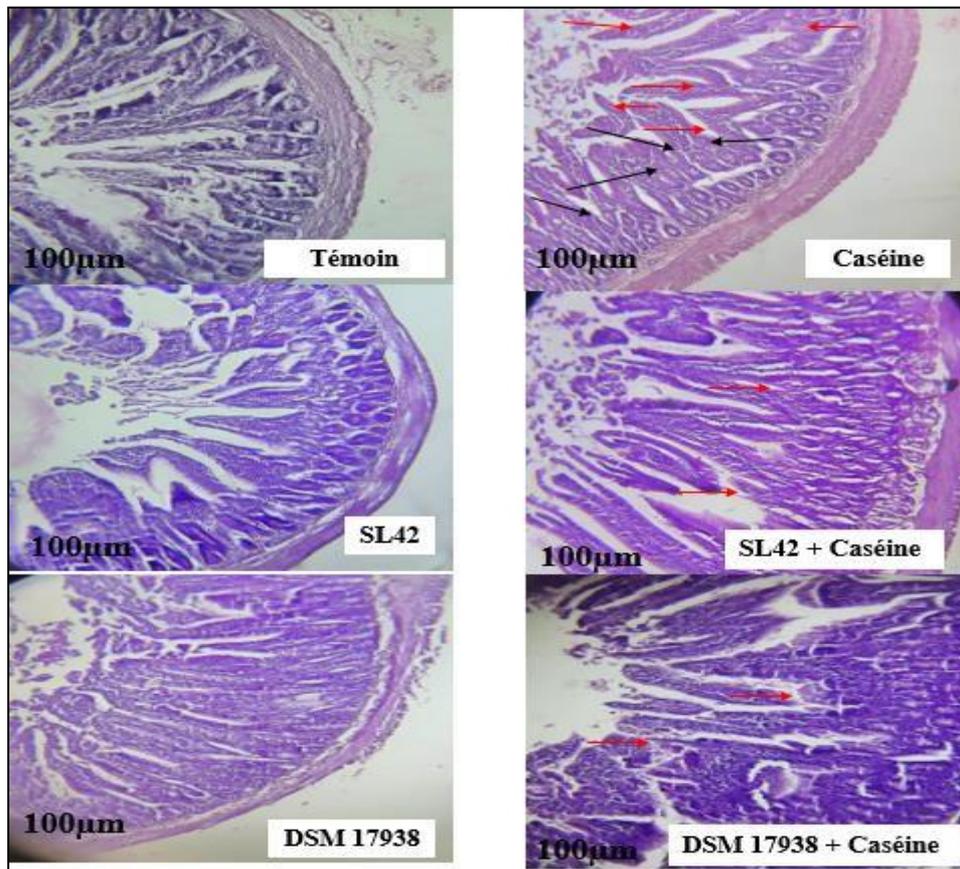


Figure 23 : Coupes histologiques représentatives de la muqueuse jéjunale et colorées à l'HE à un grossissement original de 100 μm . Des rattes Wistar ont été sensibilisées par voie intragastrique par l'administration de la caséine sans adjuvant. Les rattes ont été gavées tous les deux jours (du jour -3 au jour 58) avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à raison de 1×10^8 UFC/mL.

III.3.8. Mise en évidence de la sécurité des probiotiques par le test de translocation bactérienne

Les ganglions lymphatiques mésentériques étaient stériles dans les groupes témoins et probiotiques, tandis que la sensibilisation à la caséine entraînait une translocation bactérienne ($p < 0,05$) dans le groupe sensibilisé par la caséine seule. Le gavage probiotique a complètement éliminé la translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques dans les groupes de rats soumis à une sensibilisation à la caséine (**Tableau 14**).

Tableau 14: Translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques chez les rattes soumises à un test de provocation à la caséine.

Groupes	Nombre de rattes affectées	UFC/ MLN de ratte
Témoin	0/8	0
SL42	0/8	0
DSM 17938	0/8	0
Caséine	6/8	288*
Caséine+SL42	0/8	0
Caséine+DSM 17938	0/8	0

Les données relatives à la translocation bactérienne sont représentées par la moyenne des UFC totales cultivées dans la MLN de chaque rat (n = 8) après 48 heures d'incubation. * P <0,05 par rapport aux témoins

IV.4. Discussion

L'allergie alimentaire la plus courante chez les enfants est l'allergie au lait de vache. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour prévenir ou guérir les allergies alimentaires (**Jensen et al., 2022**). Cependant, selon certaines études, l'allaitement maternel protège le nourrisson du développement de maladies allergiques, favorise la maturation du système immunitaire du jeune enfant et le protège des infections (**Jensen et al., 2022 ; Stanojević et al., 2018**).

Le lait humain contient de nombreux composants immunologiques, tels que des bactéries probiotiques, des oligosaccharides non digestibles, des IgA sécrétoires, des mucines, des cytokines, des AGPI à longue chaîne et des hormones. Les bactéries probiotiques, en particulier, peuvent soutenir l'immunocompétence, ce qui est nécessaire pour induire une tolérance orale adéquate, soit directement, soit indirectement par la stimulation d'un microbiote intestinal bénéfique (**Muraro et al., 2014 ; Tulyeu et al., 2019**).

Les avantages de l'allaitement maternel pour la santé du nouveau-né sont significatifs, et le microbiome du lait peut jouer un rôle crucial. Dans ce contexte et dans la présente étude, nous avons cherché à étudier le potentiel probiotique des bactéries présentes dans le lait humain qui peuvent être associées à une amélioration de la santé des nourrissons et qui pourraient être utilisées dans les préparations à base de lait humain simulé. L'objectif de cette étude était de

comparer les effets des souches probiotiques provenant du lait humain sur les résultats de la réponse allergique chez les rats lors de la sensibilisation orale à la caséine bovine. Tout d'abord, une souche isolée SL42 provenant du lait maternel d'une Algérienne mère jeune et en bonne santé a été identifiée pour ses aptitudes probiotiques et comparée à la souche probiotique de *L. reuteri* DSM 17938. L'analyse de l'ARNr 16S a montré que l'isolat est un *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Par ailleurs, la souche isolée SL42 a réussi tous les tests pour être considérée comme une souche probiotique sûre, bien tolérée et efficace, capable de contribuer aux effets bénéfiques sur la santé intestinale.

On sait que les lactobacilles constituent une partie importante de la flore microbienne humaine normale qui colonise généralement la bouche, le tractus gastro-intestinal et le tractus génito-urinaire féminin (Saviano *et al.*, 2021). La communauté scientifique s'accorde sur l'importance de la spécificité de la souche dans l'action des micro-organismes probiotiques sur la santé de leurs hôtes. Selon Xavier-Santos *et al* (2004), outre les doses journalières, la recherche doit prendre en compte les multiples mécanismes d'action propres à chaque espèce/souche.

Après avoir été identifiées, les deux souches SL42 et DSM 17938 ont été incluses individuellement dans notre étude sur l'allergie induite par la caséine. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a été choisi parce qu'il est déjà distribué comme médicament aux enfants pour soulager les symptômes gastro-intestinaux. De nombreuses études cliniques ont suggéré que *L. reuteri* peut être bénéfique pour moduler le microbiote intestinal, éliminer les infections de la colite entérique, la diarrhée associée aux antibiotiques, ainsi que pour le traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*, le syndrome du côlon irritable, les maladies inflammatoires de l'intestin et la constipation chronique. *L. reuteri* réduit la durée de la diarrhée infectieuse aiguë chez les enfants et les adultes et soulage les douleurs abdominales chez les patients atteints de colite ou de maladie inflammatoire de l'intestin (Saviano *et al.*, 2021 ; Łubiech et Twarużek, 2020).

Pour définir le bon modèle d'allergie alimentaire, nous avons proposé un modèle de sensibilisation orale sans adjuvant qui imite ce qui se passe chez l'homme en utilisant le rat Wistar à l'âge juvénile. Nous pensons que notre modèle est approprié car l'administration d'un adjuvant peut influencer la réponse IgE ou provoquer une réponse IgE faussement positive avec un aliment non allergène (Pilegaard et Madsen, 2004). *Lacticaseibacillus rhamnosus* SL42, ainsi que *L. reuteri* DSM 17938 ont été administrés à des rats Wistar à l'âge de 3 semaines et stimulés oralement par de la caséine. Dans cette deuxième partie, les symptômes macroscopiques après gavage à la caséine, la calprotectine, les éosinophiles et les cytokines

associées à l'allergie induite par l'ACS, le dénombrement des bactéries fécales, le changement de poids de la rate et du thymus, l'examen du tissu jéjunal et l'infiltration des éosinophiles, ainsi que la translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques, ont été examinés. Pendant la période de sensibilisation, tous les rats semblaient en bonne santé, avec un poids similaire dans tous les groupes. En outre, aucun symptôme grave, tel que la mort, n'a été observé. Un rat du groupe sensibilisé à la caséine (uniquement) avait un score de 1, six avaient un score de 2 et un avait un score de 3. Aucune anomalie n'a été observée dans le groupe témoin ou dans le groupe traité aux probiotiques. Cela pourrait indiquer que le modèle proposé ici est légèrement allergique et que, bien qu'il provoque une légère inflammation intestinale, il peut avoir un impact à long terme sur la croissance et le développement des rats. **Stanojevic et al. (2018)** ont révélé qu'un traitement postnatal précoce avec *Lactobacillus rhamnosus* LB64 semble être efficace pour atténuer l'encéphalomyélite auto-immune du TNBS. De même, la colonisation précoce par *L. rhamnosus* GG a augmenté la richesse et la diversité du microbiote colique et a favorisé la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales ainsi que la production d'IgA au niveau des muqueuses chez les adultes (**Yan et al., 2017**).

Dans notre étude, l'administration orale de souches probiotiques de lait humain à des rats sensibilisés à la CAS a permis de réduire le score symptôme, les IgE spécifiques à la CAS et le niveau de libération d'histamine en diminuant la calprotectine et les cytokines spécifiques à l'allergène. La S100A8/A9 (calprotectine) est considérée comme un biomarqueur sensible associé aux maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la vascularite (**Okada et al., 2020**).

Nous avons également constaté que la sensibilisation au CAS seul modifiait la composition du microbiote intestinal par rapport aux témoins, en termes d'abondance relative des LAB, des bactéries non spécifiques et des espèces de *Clostridia*. Les bactéries probiotiques que nous avons testées ont été capables de restaurer une microflore bénéfique chez tous les rats traités aux probiotiques. De même, **Tulyeu et al. (2019)** ont récemment rapporté que l'immunisation allergénique dans un modèle d'allergie alimentaire induisait de profonds changements dans la composition du microbiome intestinal.

Le "syndrome de l'intestin perméable" et la translocation bactérienne sont considérés par certains auteurs comme des facteurs déclencheurs des maladies, car ils favorisent l'inflammation systémique chronique. L'administration de probiotiques par voie orale et par transplantation microbienne fécale a exprimée des avantages pour la santé (**Sato et al., 2017**).

Les thérapies axées sur la modulation du microbiote intestinal constituent donc une bonne option pour la pédiatrie en particulier, parce que ce groupe possède une communauté microbienne en développement qui est associée à la maturation du système immunitaire (Pilegaard et Madsen, 2004).

IV.5. Conclusion

Nos résultats montrent que l'administration de *L. rhamnosus* SL42 à des rattes juvéniles induit des réponses tolérogènes et sert plusieurs objectifs à la fois : de la réduction du niveau des paramètres allergiques associés à la caséine jusqu'à amélioration des symptômes macroscopiques et suppression de la translocation bactérienne vers le MLN. Ses effets sont similaires à ceux exprimés par la souche probiotique de *Lactobacillus reuteri* Protectis DSM 17938.

Chapitre IV :
**Le rôle des bactéries
probiotiques (*SL42* et *L.
reuteri DSM 17938*) du lait
humain dans l'allergie
alimentaire induite par
l'ovalbumine chez les rats
Wistar.**

Chapitre IV : Le rôle des bactéries probiotiques (*SL42* et *L. reuteri* DSM 17938) du lait humain dans l'allergie alimentaire induite par l'ovalbumine chez les rats Wistar.

IV.1. Introduction

L'œuf, l'arachide et le lait sont les trois principaux allergènes chez l'homme (**Saompon, 2004**). Chez les jeunes enfants, l'œuf est considéré comme l'un des principaux allergènes, jusqu'à ce qu'ils deviennent grands à un stade ultérieur de la vie (**Savage et al., 2007 ; Caubet et Wang, 2011**).

Pour chacun de ces aliments l'allergénicité n'est pas due à un constituant unique mais à différentes protéines qui elles-mêmes comportent de nombreuses structures moléculaires immunoactives (les épitopes), largement réparties dans la molécule. Dans l'allergie alimentaire un premier contact avec l'antigène (appelé phase de sensibilisation) avant le déclenchement de la réaction allergique est requis. Cette phase de sensibilisation est asymptomatique et dure 10 à 15 jours chez l'homme (**Strobel, 1995**).

En cas de nouvelle exposition à l'antigène, une libération rapide et massive des IgE-dépendantes par exocytose de médiateurs solubles aura lieu : soit pré-formés comme l'histamine, la sérotonine, certaines protéases ou tryptase (contenues dans les granules intracytoplasmiques à l'origine des manifestations immédiates de l'allergie) ; soit néo-formés comme les médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes), les cytokines ou les kinines qui participent aux manifestations tardives de la réaction allergiques et au recrutement secondaire des cellules inflammatoires sur le site (**Anvari et al., 2019**).

En effet, l'utilisation de modèles animaux d'allergie alimentaire est indispensable pour comprendre le mécanisme de la pathologie et pour établir de nouvelles voies thérapeutiques (**Aldemir et al., 2009**). Parmi les modèles de rongeurs les rats Brown Norway (BN) et Wistar remplissent ces conditions (**Huang et al., 2018**). Bien que les BN aient été revendiqués comme le modèle le plus approprié pour étudier les allergies alimentaires, il a récemment été démontré que les rats Wistar augmentaient le niveau d'IgE après immunisation à l'ovalbumine et développaient les principaux signes cliniques aux allergènes de l'arachide (**Sun et al., 2013**).

Les études sur les bactéries lactiques probiotiques comme ayant un effet immuno-

modulateur et en tant que thérapie substantielle attire l'intention des chercheurs en raison de

la prévalence élevée des allergies alimentaires et l'absence de remède définitif (Yu *et al.*, 2016). Plusieurs études récentes ont montré que la modulation de la population microbienne intestinale pourrait être une stratégie efficace pour contrôler la perméabilité intestinale et l'invasion d'allergènes alimentaires dans la circulation sanguine afin de maintenir l'homéostasie intestinale (Green et Klaenhammer, 1999 ; Schiffrin *et al.*, 1997). Des études antérieures ont montré que l'administration orale de *Lactobacillus casei* augmentait l'activité des cellules naturelles Killer (NK) chez les souris âgées (Hori *et al.*, 2003), une souche spécifique de *Lactobacillus pentosus* isolée à partir de cornichon japonais fermenté a montré des activités bénéfiques par modulation des T-helper type 1 en activant la production d'IL12 et l'interféron gamma (IFN- γ). La souche *Lactobacillus plantarum* isolée à partir de Kimichi était capable d'agir positivement sur la dermatite atopique (Won *et al.*, 2012). De plus, plusieurs études épidémiologiques ont mis en relation le développement des maladies allergiques avec la colonisation et la composition du microbiote intestinal chez l'enfant. Parmi ces facteurs, le lait maternel qui n'est pas stérile, contient des bactéries qui font partie des premiers à coloniser le tractus digestif de l'enfant. D'autre part, le lait maternel contient de fortes quantités d'oligosaccharides qui vont pouvoir servir de substrats à certaines bactéries intestinales capables de les digérer. Enfin, Le lait maternel assure également l'immunité passive de l'enfant *via* le transfert de grandes quantités d'Ig.

Cependant, le potentiel thérapeutique des bactéries lactiques probiotiques de genre *Lactobacillus* sp, issues du lait humain, dans la modulation des réponses allergiques n'a pas été complètement élucidé. Dans la présente étude qui a été conçue pour évaluer si l'administration orale des bactéries lactiques probiotiques isolées de lait maternel peuvent prévenir le développement de l'allergie alimentaire, nous utilisons le rat Wistar comme modèle murin pour une sensibilisation orale à l'ovalbumine (OVA).

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1. Bactéries

Dans ce chapitre nous avons suivi le même protocole appliqué dans le chapitre précédent (chapitre III) avec des modifications spécifiques dans la partie *in-vivo*.

IV.2.2. Élevage des animaux

Selon la même méthode d'élevage décrite dans le chapitre III, des rattes en âge juvénile issues de la troisième génération ont fait l'objet de ce travail.

Toutes les procédures ont été approuvées par le Comité d'éthique animale de l'Université de Mostaganem et autorisées par le conseil du laboratoire LMBAFS.

IV.2.3. Induction de l'allergie à l'ovalbumine *in-vivo*

L'expérimentation *in-vivo* est illustrée dans **la figure 24**. Les rats ont été divisés au hasard en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin (C), groupe non sensibilisé et traité avec la souche SL42, groupe non sensibilisé et traité avec la souche DSM 17938 (DSM 17938), groupe sensibilisé à l'ovalbumine et non traité (OVA), groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec la souche SL42 (OVA + SL42) et groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec DSM 17938 (OVA + DSM 17938).

Chaque rat des groupes traités avec une probiotique a été gavé 3 jours successifs avec 10^8 UFC de DSM 17938 ou de SL42 (dans 1mL d'eau physiologique) et ce avant la provocation à l'ovalbumine. Les groupes OVA, OVA + SL4 et OVA + OVA + DSM 17938 ont été sensibilisés quotidiennement avec l'ovalbumine sans adjuvant du jour 1 au jour 14 avec $150\mu\text{g OVA/g NaHCO}_3$ dans 1mL de PBS, ensuite 5/7 jours.

La sensibilisation à l'ovalbumine a été interrompue pendant une semaine (de j42 au j49). Ensuite, elle a été augmentée à $750\mu\text{g OVA/g}$ et administrée une seule fois 24h avant le sacrifice.

Les mêmes méthodes ont été suivies telles que décrites dans **le chapitre III** (l'enregistrement des symptômes macroscopiques, la détermination des paramètres sanguins, la culture de la matière fécale et l'étude histologique).

IV.2.4. Analyse statistique

La signification statistique a été déterminée par les tests t Student et Tukey, Les différences à $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

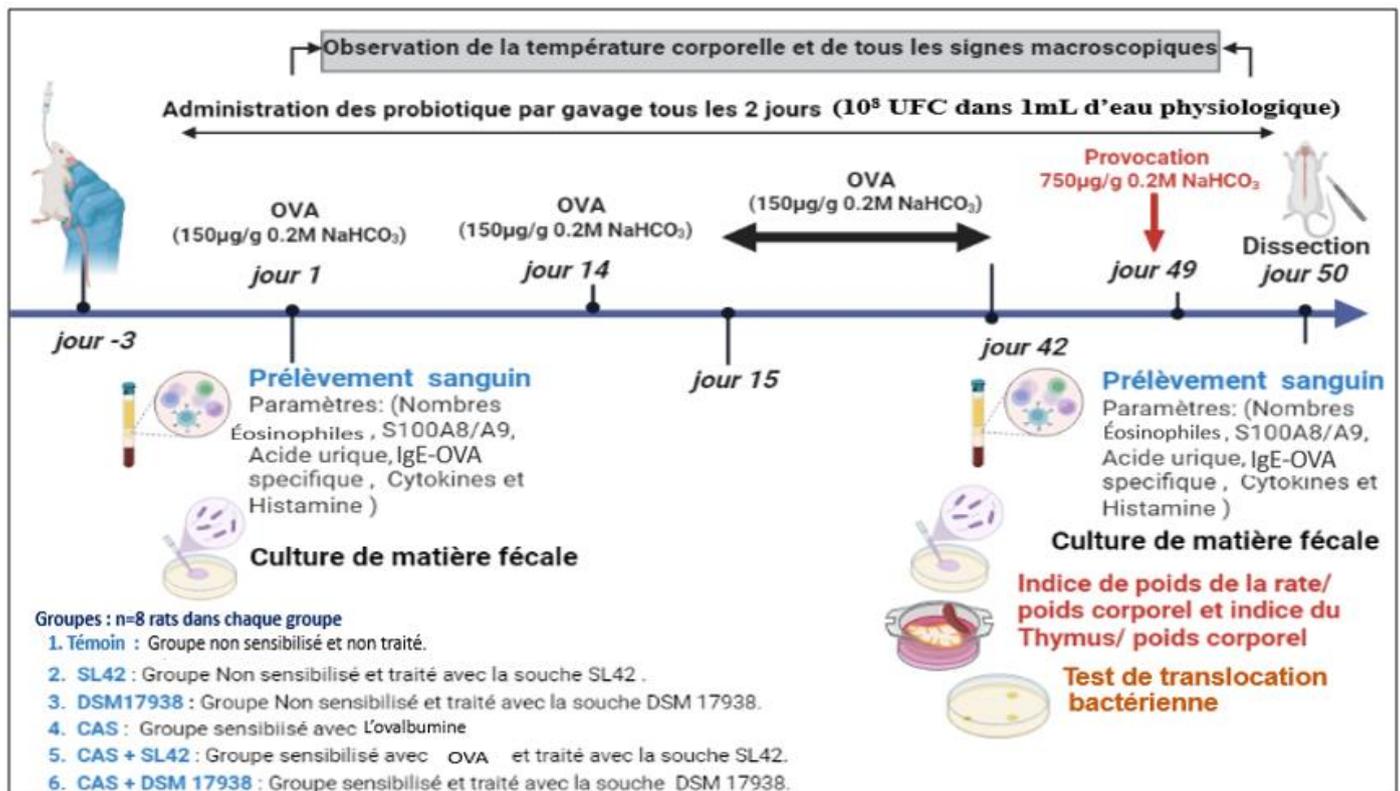


Figure 24 : Schéma expérimental et groupes de rats examinés dans le cadre de la présente étude. L'ovalbumine a été utilisée comme allergène et administrée par voie intra-gastrique à des rattes sans adjuvant. 48 rattes femelles (âgées de 3 semaines) ont été réparties en 6 groupes (n= 8 rats dans chaque groupe) : groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 1938), groupe sensibilisé à l'OVA (groupe OVA), groupe sensibilisé à l'ovalbumine traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) et groupe sensibilisé à l'ovalbumine traité avec la souche DSM 19738 (groupe OVA+DSM 19738). Dans tous les groupes de rats traités aux bactéries, SL42 ou DSM 17938 ont été administrées 1/2 jour du jour -3 au jour 50.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Les symptômes macroscopiques suivant le gavage à l'ovalbumine

L'induction de l'allergie à l'OVA était réussie où la sensibilisation orale chez les rats Wistar était accompagnée de signes cliniques. Le score diarrhéique (**figure 25**) était de 7 et 4 sur l'échelle de Bristol, accompagné d'une baisse de la température corporelle, respectivement pour les rats recevant exclusivement l'OVA (90 % des rats) ou de l'OVA associée aux probiotiques (30 % des rats). L'anaphylaxie était évaluée à 3 et 5 (**figure 26**) avec une cyanose autour des oreilles, un gonflement de la bouche et une réduction de d'activité motrice durant les 3 heures qui suivaient le gavage.

Une baisse de température (**figure 27**) remarquable a été observée après 30min de sensibilisation : à 32°C dans le groupe OVA et 34°C dans ceux gavés d'une seule bactérie probiotique+OVA. Ces derniers réaffichent des températures corporelles normales après 120 min d'exposition (plus de 180 min pour le groupe OVA). Les groupes ayant reçu les probiotiques seules ont maintenus, comme le témoin, une température de 37°C tout au long de l'étude.

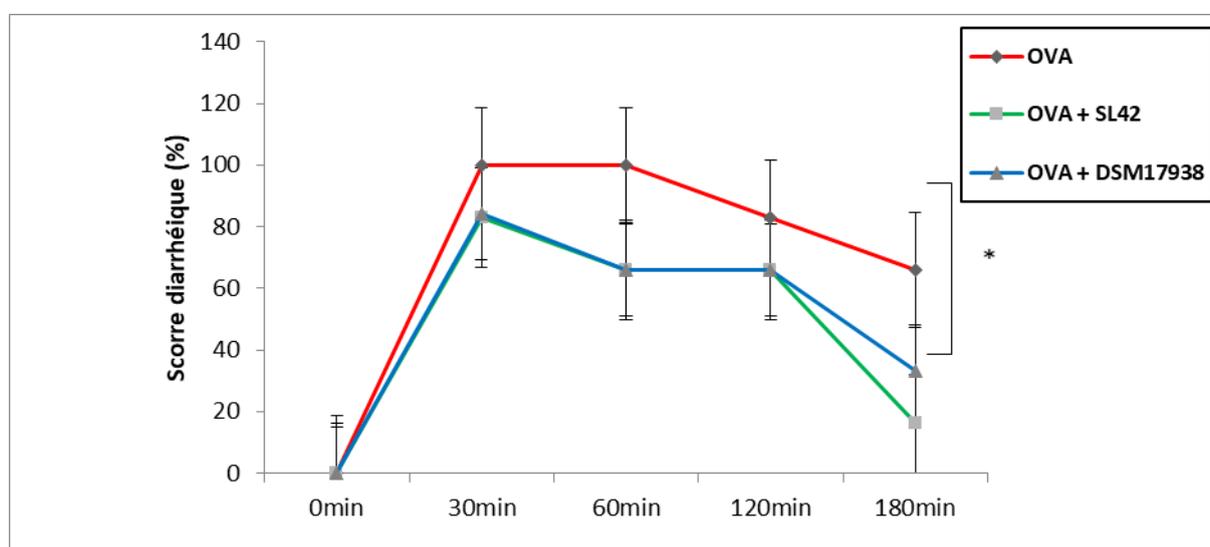


Figure 25 : Variation de la température corporelle (°C) et de score diarrhéique après 3h de défi à l'OVA. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Une différence significative a été observée à $P > 0,05$.



Figure 26 : Démangeaison et irritation de l'oreille et de la bouche chez les rats du groupe sensibilisé à l'OVA après 3h de défi.

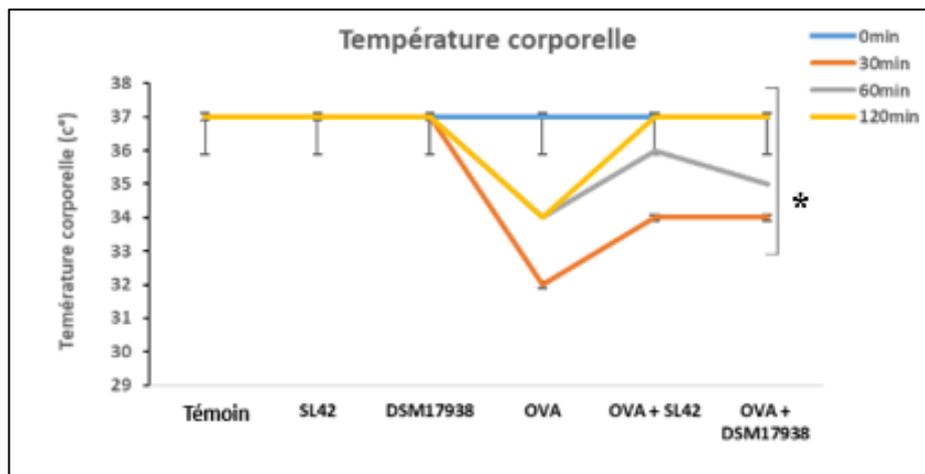


Figure 27 : Variation de la température corporelle (°C) au cours le défi à l'OVA. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Une différence significative a été observée à $P > 0,05$.

L'augmentation du taux d'acide urique dans le sang (**figure 28**) des rats sensibilisés indique un stress inflammatoire confirmant l'apparition des différents signes cliniques. Ainsi, des valeurs significativement élevées dans le groupe OVA de l'ordre de 55.40 ± 0.98 mg/L ont été enregistrées, et ce par rapport aux groupes traités aux probiotiques : SL42+OVA avec 49.36 ± 1.52 mg/L et OVA+ DSM 19738 avec 50.49 ± 1.87 mg/L. Les groupes témoins et ceux gavés de SL42 ou de DSM 19738 ont affichés des valeurs allant de 34 à 39 mg/L.

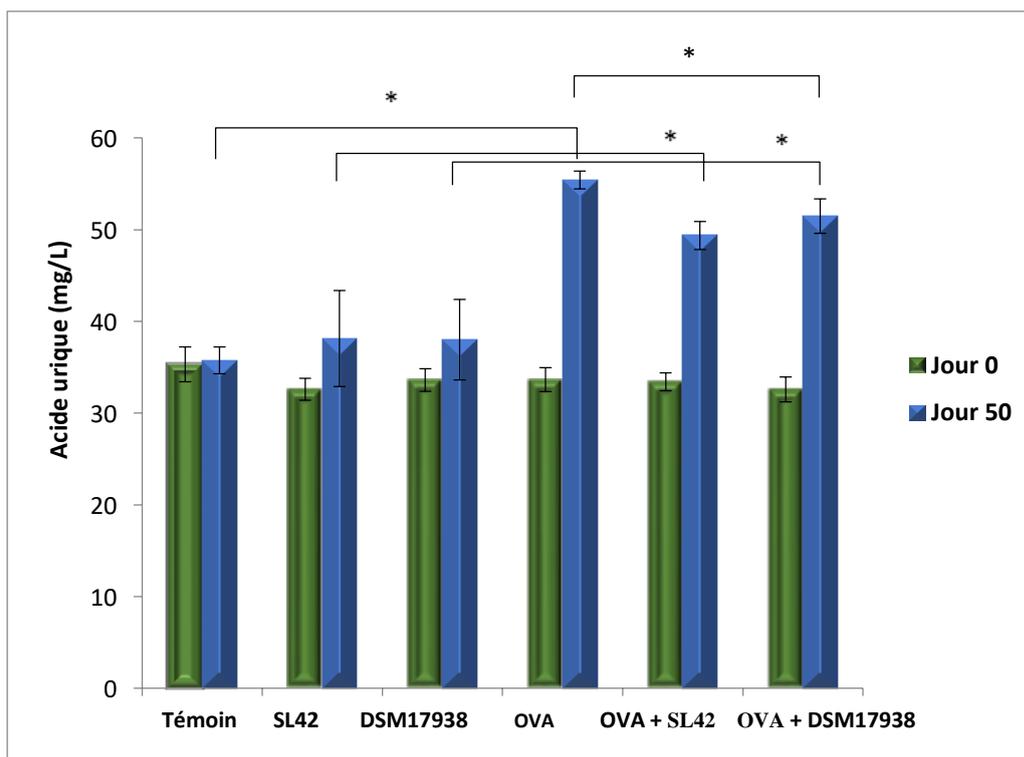


Figure 28 : Taux d'acide urique dans le sérum des rats avant (1^{er} jour) et après (50^{ème} jour) la provocation par l'OVA. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). * Des différences significatives ont été observées à P < 0,05.

De manière coordonnante, ces signes cliniques répondent de manière négative sur le poids corporel (**Figure 29**) des rats sensibilisés. Une différence significative dans le poids corporel a été observée entre les groupes expérimentaux et les groupes témoin et ceux ayant reçu exclusivement une bactérie probiotique sans OVA (tous P > 0,05). Cette disparité dans le gain corporel a été noté pendant toute la durée de l'étude, plus clairement après une semaine de l'induction à l'OVA.

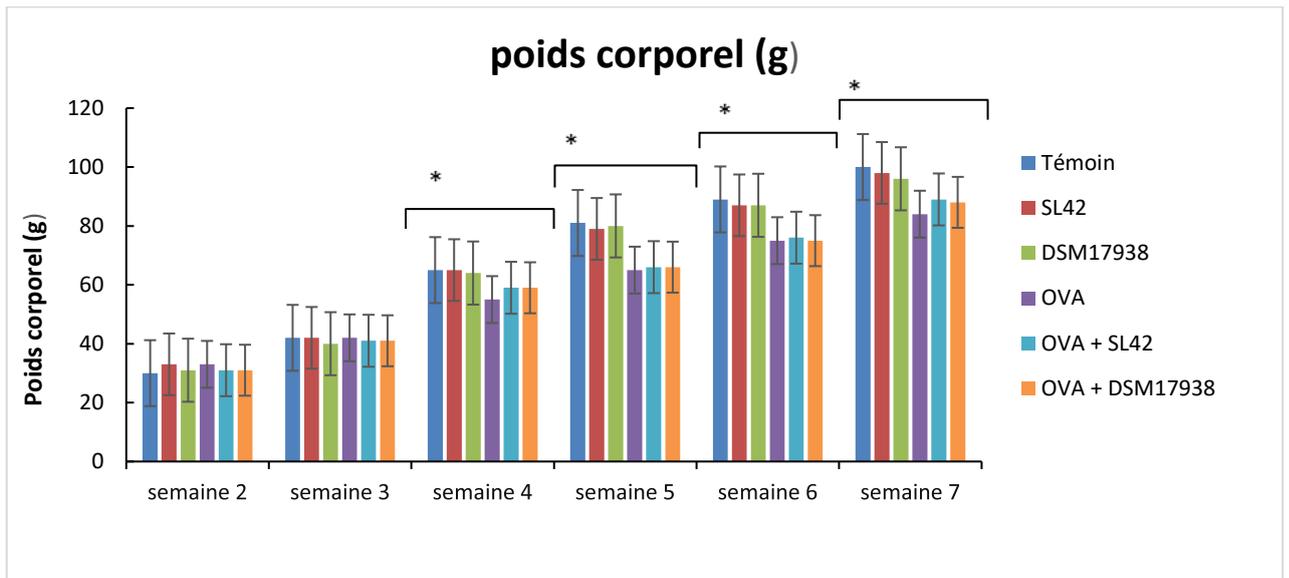


Figure 29 : Variation du poids corporel (g) avant (1^{ier} jour) et après (50^{ème} jour) de défi d'OVA. Les valeurs sont représentées par les moyennes \pm SD (n = 8 rats/groupe). Une différence significative observée à $P > 0,05$.

IV.3.2. Les IgE spécifique à l'OVA et taux d'histamine associés à l'allergie induite par l'OVA

Les taux sériques ont été significativement plus élevés ($P < 0,05$). Les animaux de groupes témoins ou recevant le probiotique sans allergène n'ont pas présenté des IgE spécifiques à l'OVA dans leurs sérums. La sensibilisation avec l'OVA déclenche la production d'IgE spécifiques, 57.11 ± 2.88 UI/L en moyenne pour le groupe. Des diminutions significatives ($P < 0,05$) de 38.35% dans le groupe traité avec SL42 (35.21 ± 0.89 UI/L) et de 30.70 % ($P < 0,01$) dans le groupe traité avec DSM 19738 (de 39.53 ± 1.3 UI/L), ont été observées (**Figure 30a**). De plus, le même constat est à souligner pour la concentrationsérique d'histamine où un taux significativement ($P < 0,05$) élevé a été relevé chez le groupe OVA de 41 ± 2 nmol/L en moyenne. Les taux d'histamine dans les groupes OVA et traités avec les probiotique ont permis une diminution de 40 % pour celui avec SL42 et de 24% pour le groupe traité avec la bactérie probiotique de référence (**Figure 30b**). Ainsi, ces résultats montrent un effet immuno-protecteur plus prononcé chez la bactérie isolée SL42 comparée à la souche de référence DSM 19738.

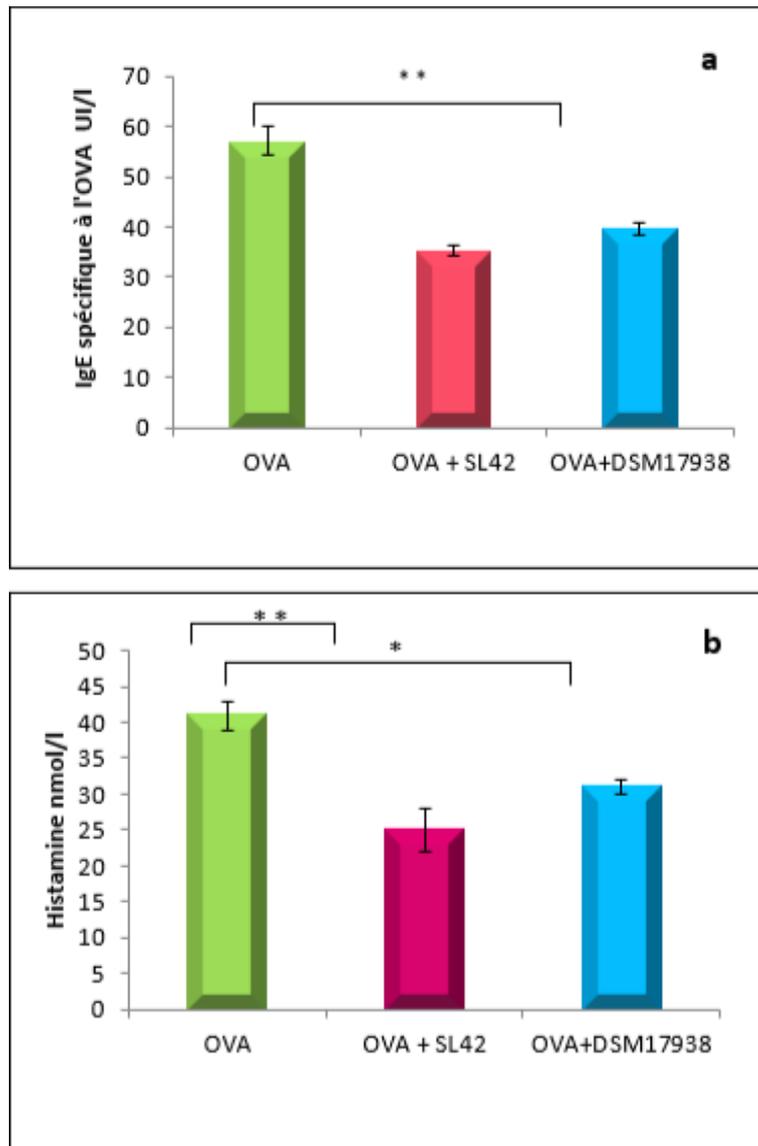


Figure 30 : Les niveaux d'IgE OVA (a) et d'histamine (b) dans le sérum ont été déterminé par ELISA (n = 8 rats/groupe). Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * P < 0.05. Groupe sensibilisé à l'OVA (groupe OVA) ; groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec SL42 (groupe OVA+SL42) ; groupe sensibilisé à l'OVA et traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938).

IV.3.3. Les éosinophiles, la calprotectine et les cytokines associés à l'allergie induite par l'OVA

Le nombre d'éosinophiles (**figure 31**) a été hautement augmenté ($P < 0.001$) en moyenne de $245.5 \pm 9.11 \text{ mm}^3$ chez les rattes sensibilisées sans traitement probiotique. L'administration de probiotique SL42 diminue le nombre à 59.49% chez les rattes du groupe OVA+SL42. Par ailleurs, l'administration de DSM 17938 diminue le nombre d'éosinophiles à 55.80% chez les rattes du groupe OVA+DSM 17938, comme le montre **la figure 31**. Les éosinophiles restent en tau normal chez les groupes témoin (en moyenne de $51.33 \pm 2.62 \text{ mm}^3$) et ceux ayant reçu une bactérie probiotique ($51.33 \pm 3.30 \text{ mm}^3$ dans le groupe SL42 et $50.75 \pm 2.87 \text{ mm}^3$ dans le groupe DSM 17938).

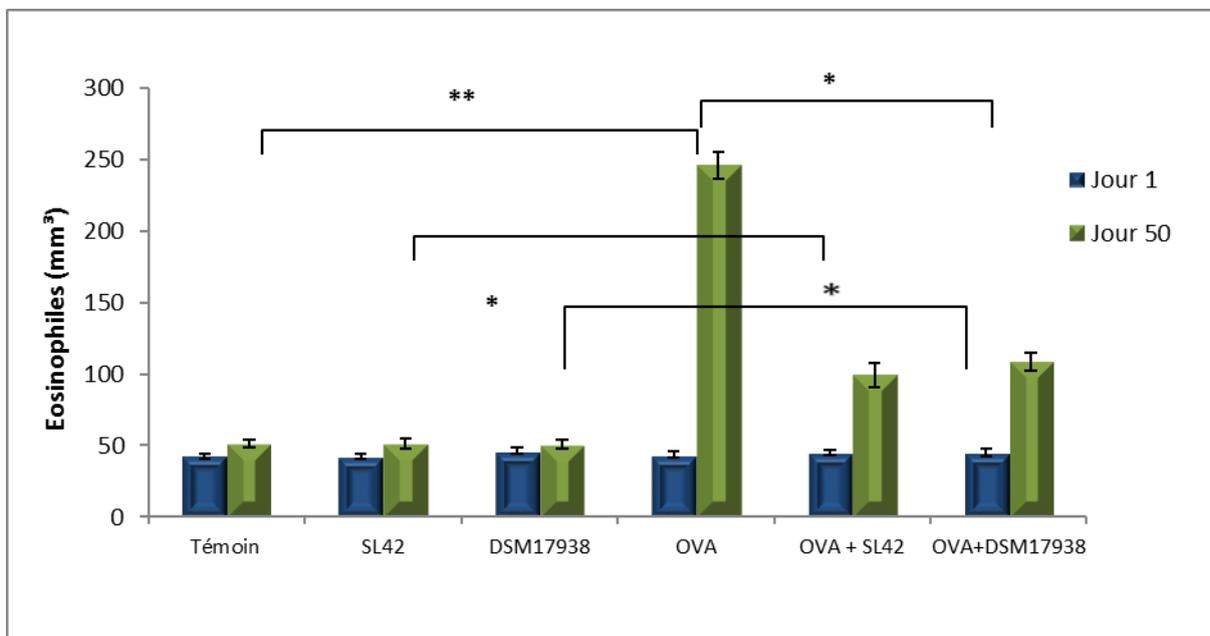
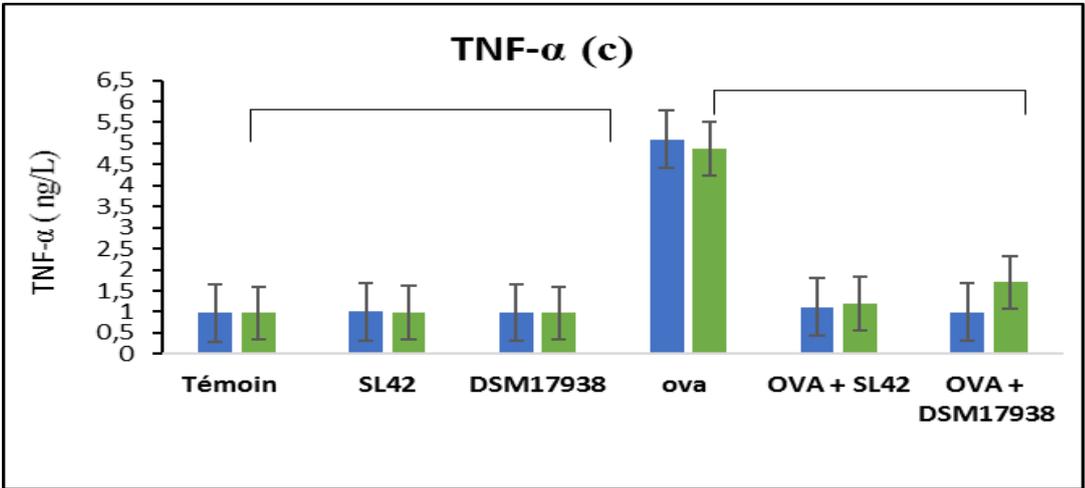
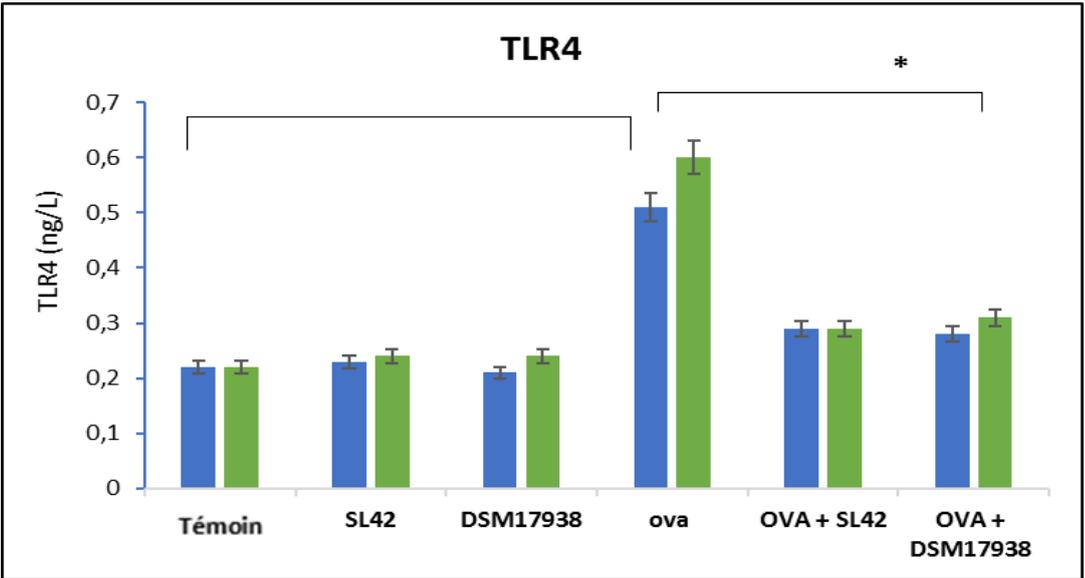
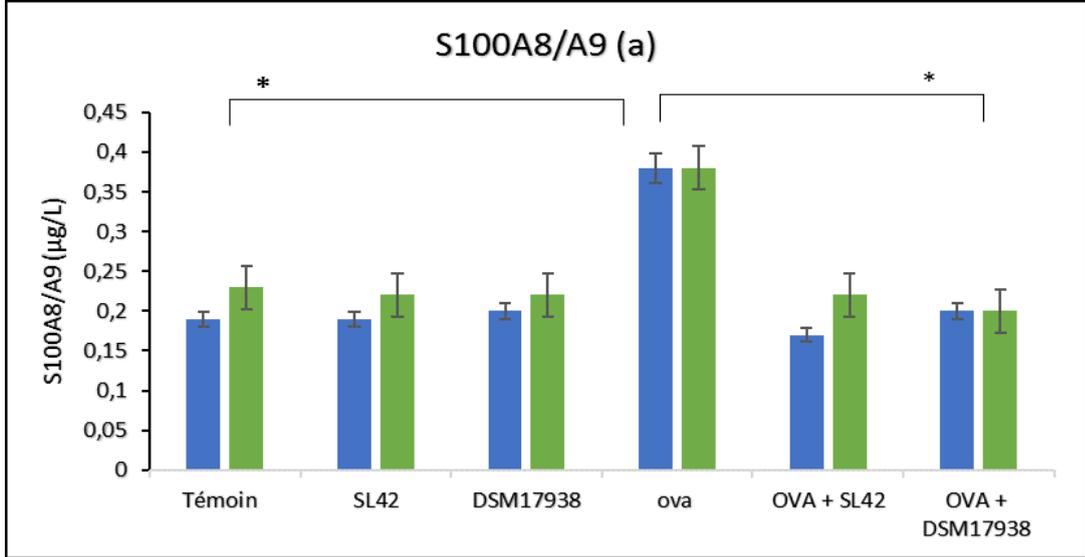


Figure 31 : L'effet de l'administration de la souche de référence DSM17938 et la souche SL42 isolée sur le nombre d'éosinophiles déterminé par la technique d'hémogramme. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM de 4 à 8 rattes / groupe. Une différence significative observée à $P < 0,001$.

Le niveau de S100A8/A9 était statistiquement différent au jour 1 et au jour 50 (tous P <0,05) comme le montre **la figure 32a**. Les deux souches probiotiques (SL42 et DSM17938) ont diminué la calprotectine (S100A8/9) chez les rats traités.



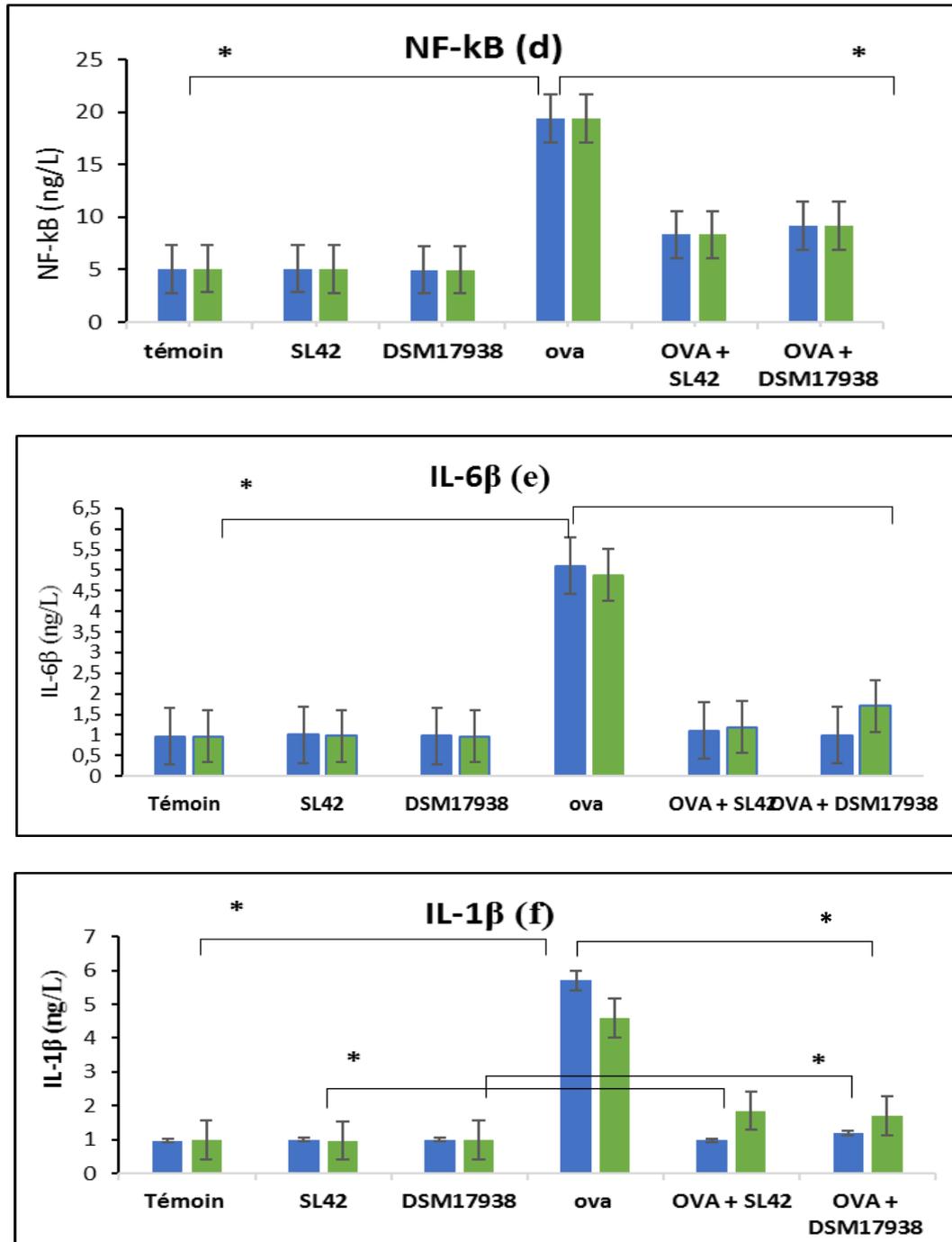


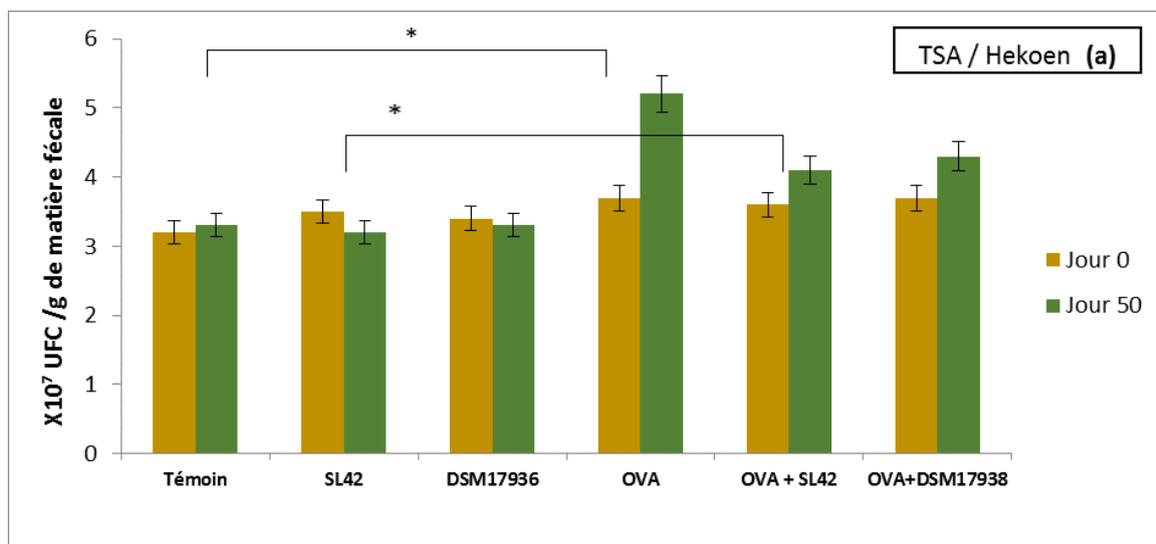
Figure 32: Expression de S100A8/A9 et des cytokines associées chez le rat Wistar sensibilisé à la caséine sans adjuvant et par voie intra-gastrique (avant le 1^{er} jour, après le 50^{ème} jour). Niveaux de S100A8/A9 (a), TLR4 (b), TNF- α (c), NF- κ B (d), IL-6 β (e) et IL-1 (f) dans le sérum des rats de différents groupes. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n= 8 rats/groupe). * P < 0.05. ** P < 0.01. Groupe témoin (groupe C), groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42), groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938), groupe sensibilisé à l'OVA (groupe CAS), groupe sensibilisé à l'OVA

traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) et groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938).

IV.3.4. Le dénombrement des bactéries LAB et de *Clostridia* dans les fèces

Nous avons d'abord confirmé si les deux bactéries probiotiques testées s'implantent dans l'intestin des rattes Wistar et ce dès le 3^{ème} jour d'administration, précédant la 1^{ère} provocation. Après 96h de gavage de probiotique (des 2 souches) la viabilité des deux souches a été augmentée de manière significative ($P < 0.05$) sachant qu'elle était entre $2.10^8 - 2.5.10^8$ UFC/mL et devient 3.10^8 et 4.10^8 UFC/mL (**figure 33a et b**).

Nos résultats montrent que les deux bactéries probiotiques testées étaient capables de s'implanter dans l'épithélium intestinal et d'y exercer des effets positifs chez les rattes allergiques à l'OVA. Les effets délétères observés traduisent des altérations du microbiote intestinal des rattes allergiques. L'administration des souches probiotiques a restauré la biomasse en bactéries bénéfiques (LAB) où la charge était significativement augmentée dans les groupes probiotiques sans le défi OVA (SL42 et DSM 17936) et ceux rendus allergique (OVA + SL42, OVA + DSM17936).



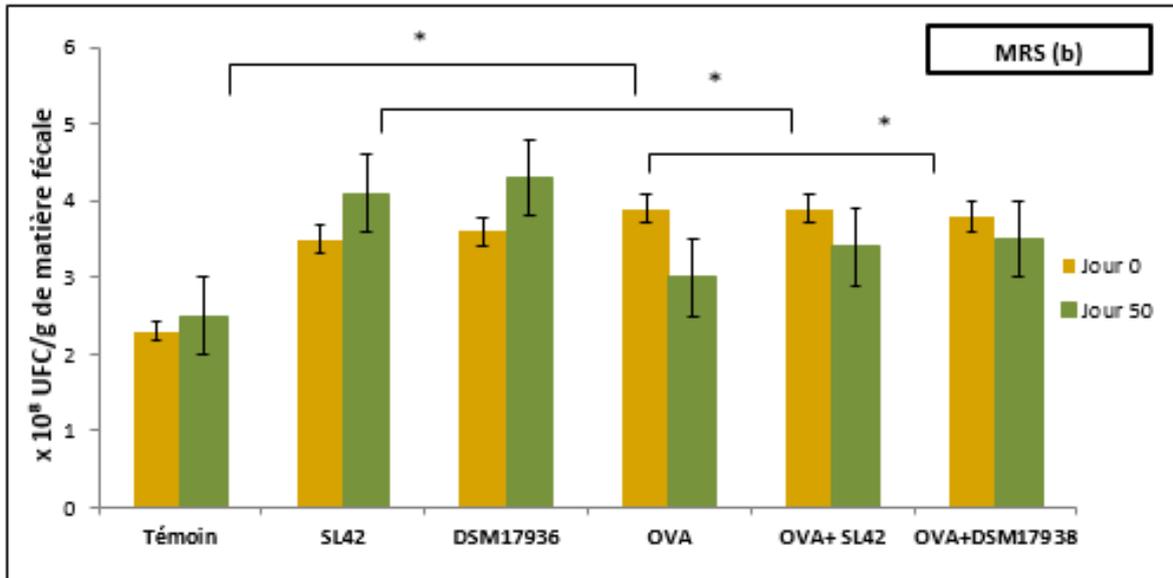


Figure 33 : Nombre de bactéries déterminé par la technique de l'ensemencement (n= 8 rats/groupe). Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de l'OVA sans adjuvant. Les rats ont été nourris 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 UFC/mL (les fèces ont été collectées au 50^{ème} jour). Le volume de la dose était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution PBS stérilisée. Les données (MRS, MRS-cys, TSA II, Hektoen) sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à sens unique avec le test de comparaisons multiples de Tukey. * $P < 0.05$. Groupe témoin (groupe C) ; groupe non sensibilisé traité avec la souche SL42 (groupe SL42) ; groupe non sensibilisé traité avec la souche DSM 17938 (groupe DSM 17938) ; groupe sensibilisé à l'OVA (groupe CAS) ; groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche SL42 (groupe OVA+SL42) ; et groupe sensibilisé à l'OVA traité avec la souche DSM 17938 (groupe OVA+DSM 17938).

IV.3.5. Effets des probiotiques sur les poids relatifs de la rate et du thymus

La figure 34 montre les effets des deux souches de SL42 et DSM17938, sur les indices du thymus et de la rate des souris. Par rapport aux souris témoins, les indices du thymus et de la rate dans chaque groupe traité par *Lactobacillus* ont montré une différence significative $p < 0.05$.

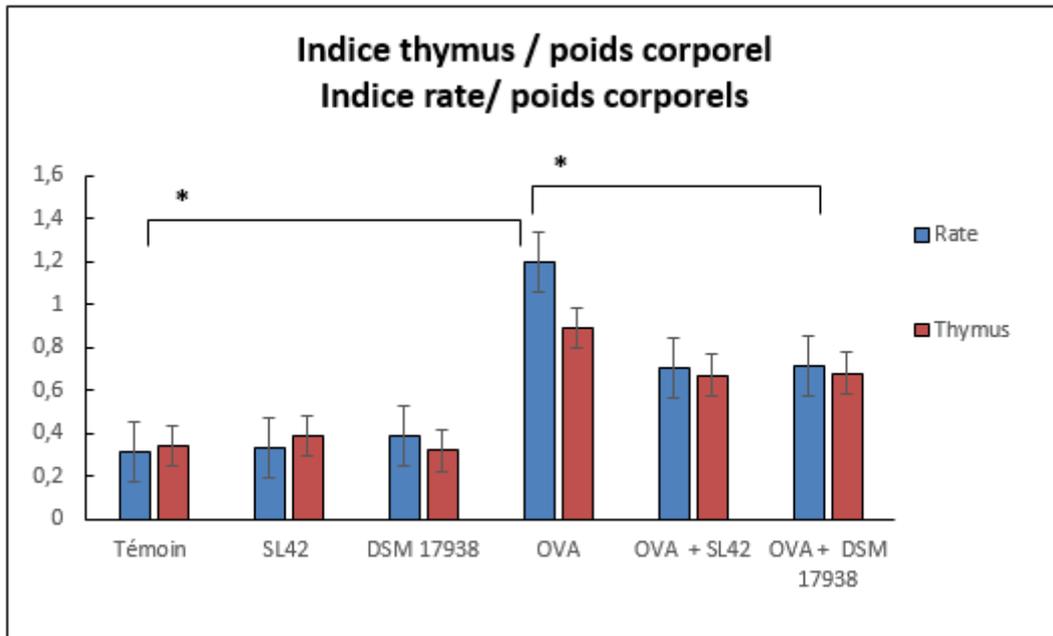


Figure 34 : Effets des bactéries probiotiques sur les indices du thymus et de la rate des rats. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration de l'ovalbumine sans adjuvant. Les rats ont été nourris 1/2 jour avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à 1×10^8 CFU/mL. Le volume de la dose était de 1 mL. Le groupe témoin a été nourri avec une solution PBS stérilisée. Des échantillons de thymus et de rate de chaque groupe ont été prélevés au 50^{ème} jour (jour du sacrifice). Les indices du thymus et de la rate ont été mesurés par le rapport entre le poids du thymus ou de la rate et le poids corporel du rat. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM (n= 8 rats/groupe).

IV.3.6. L'effet de l'administration des probiotiques sur la morphologie intestinale

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des coupes de jéjunum a montré une muqueuse de type intestinal au relief villositaire conservé et tapissé d'un épithélium cylindrique régulier avec un nombre de lymphocytes intra-épithéliaux, surmontant une *lamina propria* aux glandes régulières avec hyperplasie des cellules caliciformes (flèches rouges) et siège d'un infiltrat à éosinophiles (flèches noires) chez les rattes allergiques qui n'ont reçu aucun traitement. Les groupes ayant reçu des probiotiques ont affiché une régression significative de l'intensité de cet infiltrat inflammatoire à polynucléaire éosinophiles et aussi de l'hyperplasie des cellules caliciformes (**figure 33**).

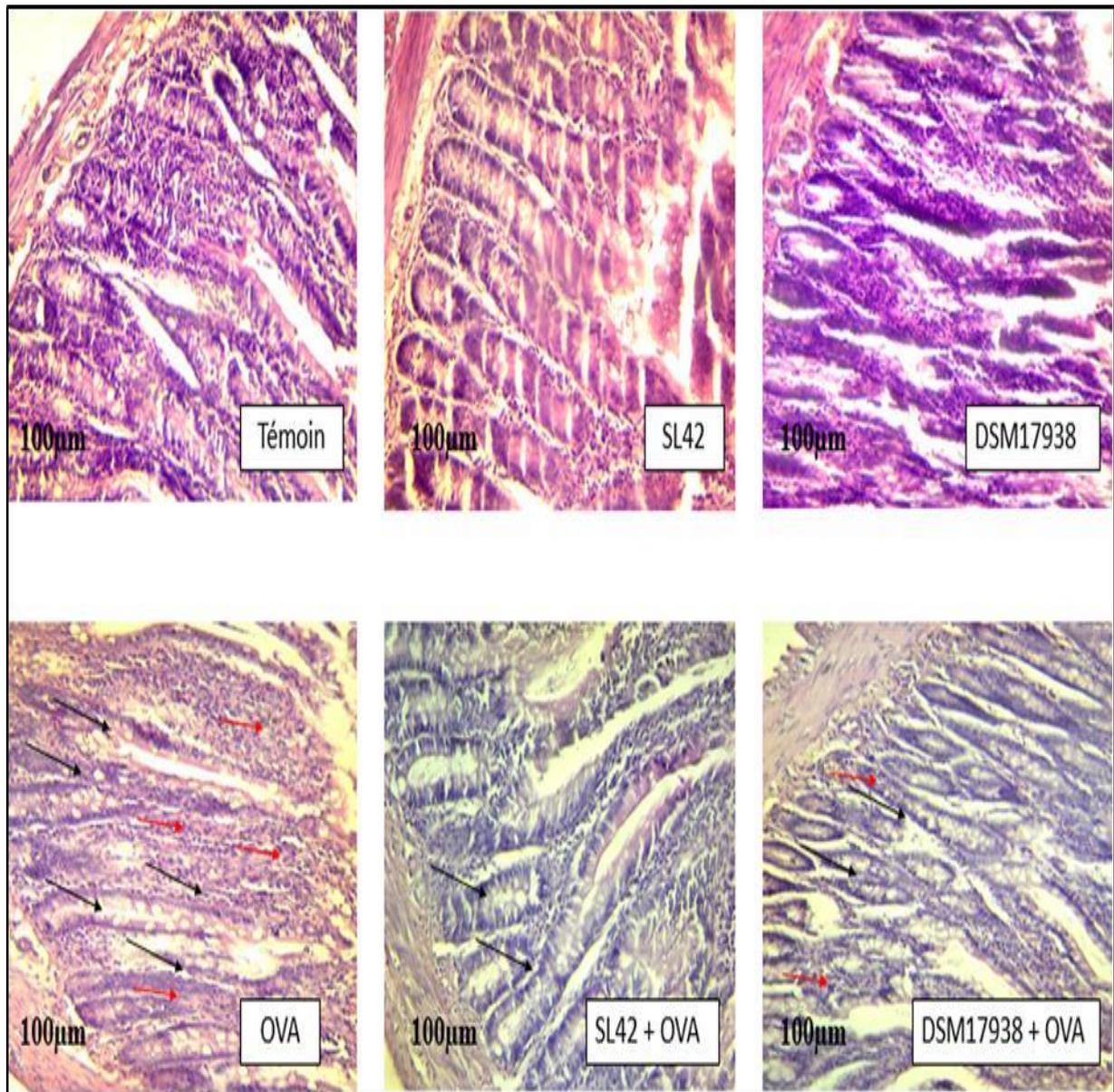


Figure 35 : Coupes représentatives de la muqueuse jéjunale colorée à l'HE à un grossissement original de 100 µm. Des rats Wistar ont été sensibilisés par voie intra-gastrique par l'administration d'ovalbumine sans adjuvant. Les rats ont été gavés 1/2 jours du jour -3 au jour 49 avec *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 à raison de 1×10^8 UFC/mL. Cellules caliciformes (flèches rouges) et siège d'un infiltrat à éosinophiles (flèches noires)

IV.3.7. L'effet d'ovalbumine sur les ganglions lymphatiques mésentériques et la mise en évidence de la translocation bactérienne

L'examen histo-pathologique a montré que les mésentères des groupes allergiques contiennent entre 2 et 3 ganglions enflés mesurant 2-3mm de diamètre qui ont été aussicolorés à l'hématoxyline et à l'éosine pour savoir l'aspect histopathologie de ces adénites. L'examen microscopique montre un tissu lymphoïde présentant une architecture conservée, avec des follicules lymphoïdes (flèches rouges) légèrement hyperplasiques de taille variable, aux centres germinatifs souvent élargis, renfermant des macrophages (flèches noires) d'aspect réactionnel sans signes de spécificité ou de malignité comme la montre **la figure 34**.

Les ganglions lymphatiques mésentériques des groupes témoin et traités aux probiotiques étaient stériles (**tableau 16**), alors que la sensibilité à l'ovalbumine entraînait une translocation bactérienne ($P < 0,05$) dans le groupe de rats +OVA. Il s'avère que l'administration intra-gastrique de probiotiques supprime complètement la translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques.

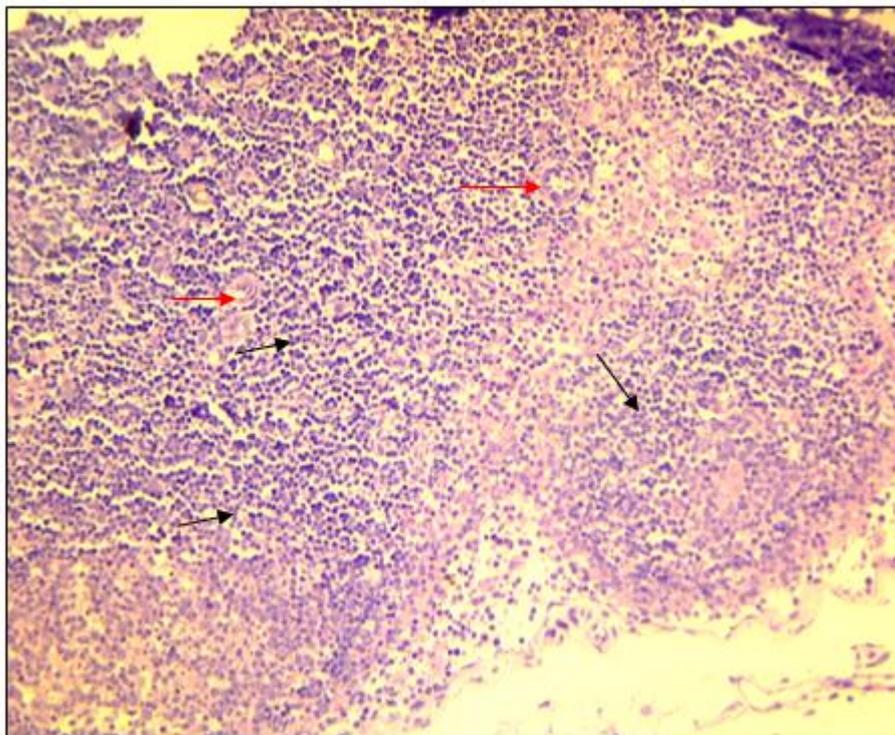


Figure 36 : Aspect histo-pathologique des ganglions mésentériques du groupe qui a reçu l'ovalbumine seule (+OVA). Après le sacrifice, les mésentères ont été examinés pour mettre en évidence l'existence d'adénites, de follicules lymphoïdes (flèches rouges) et de macrophages (flèches noires).

Tableau 15 : Mise en évidence de la translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques mésentériques chez les rattes soumises à un test de provocation à l'ovalbumine.

Groupes	Nombre de rattes affectées	UFC/ MLN de ratte
Témoin	0/8	0
SL42	0/8	0
DSM 17938	0/8	0
OVA	6/8	421*
OVA+SL42	0/8	0
OVA+DSM 17938	0/8	0

Les données relatives à la translocation bactérienne sont représentées par la moyenne des UFC totales cultivées dans la MLN de chaque rat (n = 8) après 48 heures d'incubation. * P <0,05 par rapport aux témoins

IV.4. Discussion

Les lactobacilles sont des espèces largement utilisés comme probiotiques dans les aliments fonctionnels. Les souches probiotiques de *Lactobacillus* sont bien connues pour leurs propriétés préventives et thérapeutiques (Caoa *et al.*, 2020).

Bien que les probiotiques exercent leurs effets biologiques de différentes manières et que les mécanismes de ces effets bénéfiques ne sont pas clairement compris, on pense que l'immuno-régulation est l'un des mécanismes les plus impliqués (Loh *et al.*, 2018). Les effets immuno-régulateurs des probiotiques sont suggérés comme étant spécifiques à la souche. Par conséquent, dans les dernières années, de nombreuses recherches ont été menées pour cribler des probiotiques ayant des effets immuno-modulateurs.

Dans cette étude, nous avons vérifié si *L. rhamnosus* SL42 ou *L. reuteri* DSM 17938 d'origine lait humain à statut probiotique pourraient atténuer les manifestations gastro-intestinales, les altérations histo-pathologiques intestinales et la réponse immunitaire allergique et induite par des provocations orales avec l'allergène alimentaire. Nous avons choisi le rat Wistar car il s'agit d'une souche qui génère une réponse IgE adéquate et des manifestations cliniques de l'allergie alimentaire (Sun *et al.*, 2013). Le modèle de rat avec sensibilisation systémique a démontré une production d'IgE spécifiques de l'allergène, les symptômes macroscopiques après gavage à l'allergène, la calprotectine, les éosinophiles, les cytokines, le changement des poids de la rate et du thymus, l'examen du tissu jéjunal et de l'infiltration des éosinophiles, ainsi que la translocation bactérienne vers les ganglions

lymphatiques mésentériques, sont des caractéristiques immunologiques de l'allergie alimentaire (**Mokhtari-Zaer et al., 2020**).

Les animaux testés dans la présente étude présentaient également une augmentation du taux d'histamine dans le sérum. En ce qui concerne la réponse anaphylactique, après gavage à l'OVA, les animaux ont présenté des manifestations cutanées et gastro-intestinales, principalement des diarrhées et de baisse de température corporelle. Ces signes étaient accompagnés d'une augmentation en taux d'acide urique dans les sérums des rats sensibilisés. Les animaux ont aussi développé un choc anaphylactique après 16 jours d'induction, conduisant à la mort.

Le système muqueux est la première ligne de défense du système immunitaire de l'hôte. La plupart des allergènes alimentaires pénètrent dans le corps humain par les muqueuses dont la muqueuse intestinale est la plus étroitement liée à l'allergie alimentaire. Le système muqueux intestinal peut induire une tolérance immunitaire et prévenir les allergies alimentaires grâce au tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et aux divers lymphocytes. En outre, la diversité et l'abondance du microbiote intestinal peuvent également intervenir dans le système immunitaire de l'hôte pour inhiber l'allergie alimentaire (**Chinthrajah et al., 2016**).

Dans la présente étude, nous avons démontré que l'administration des probiotiques d'origine humaine induit une réduction significative dans le développement de l'allergie alimentaire, en diminuant la réponse des anticorps IgE et d'histamine, les manifestations cliniques allergiques, l'inflammation intestinale et les altérations histo-pathologiques de la muqueuse intestinale générées par l'inflammation chronique sous-jacente.

En outre, les probiotiques du genre *Lactobacillus* cible le milieu inflammatoire intestinal en réduisant l'expression des interleukines et oriente le profil vers des réponses régulatrices. Les IgE sont produites de manière systémique pendant la phase d'induction ou de sensibilisation de l'allergie alimentaire, et sont ensuite générées et sécrétées de manière persistante dans les tissus en cas d'exposition locale à l'allergène (**Loh et al., 2018**). Les anticorps IgE et IgG sont liés à la réponse anaphylactique dans les modèles de rongeurs et chez l'homme (**Gupta et al., 2011; Gupta et al., 2019**).

Les animaux traités avec des probiotiques ont vu leur taux d'IgE et leurs signes d'anaphylaxie alimentaire diminuer, ce qui montre que l'IgE est un anticorps clé impliqué dans la réponse anaphylactique dans notre modèle expérimental. En outre, l'élévation de l'histamine est associée aux signes cliniques des réactions allergiques, principalement aux manifestations

gastro-intestinales comme ça été démontré dans la littérature (**Gerber et al., 2019**). Nos résultats montrent que l'histamine sérique était significativement plus faible chez les animaux traités, ce qui est en accord avec la faible incidence de la réaction anaphylactique. D'autre part, les IgE et les symptômes gastro-intestinaux de l'anaphylaxie alimentaire dépendent également des mastocytes (**Aquilante et al., 2023**).

L'activation des mastocytes par l'allergène induit la dégranulation, avec la libération de médiateurs préformés, d'enzymes et de cytokines, comme l'histamine, les protéases et le TNF- α . L'histamine induit une vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire et déclenche la formation d'œdèmes (**Brandt et al., 2003**). Cette substance vasoactive a été associée à la diarrhée chez des souris comme modèles d'allergie alimentaire (**Enokida et al., 2022**). Le TNF- α est impliqué dans le recrutement de cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les éosinophiles et a récemment été trouvé élevé chez les patients atteints d'allergie alimentaire. De plus, il existe une boucle de rétroaction positive entre les mastocytes et l'IL-1, car l'IL-1 est capable d'induire la libération d'histamine par les mastocytes et les médiateurs libérés par ces cellules augmentent la production d'IL-1 (**Lamubol et al., 2021**). Ainsi, le faible nombre de mastocytes présents dans l'intestin des animaux traités au lactobacilles et la diminution de l'expression du TNF- α et de l'IL-1 β pourraient être à l'origine de la cessation de la diarrhée et de l'œdème intestinal après provocation allergénique.

L'exposition orale continue à l'allergène induit des changements histologiques intestinaux qui sont associés à la réaction de phase tardive de l'allergie alimentaire et à l'état d'inflammation chronique intestinale (**Mizuno et al., 2021**).

Chez nos animaux atteints d'allergie alimentaire, les altérations intestinales se sont manifestées par la réduction de la longueur des villosités, l'augmentation de la profondeur des cryptes et l'épaississement de la couche musculaire interne. Ces changements étaient accompagnés d'une hyperplasie des éosinophiles dans la *lamina propria* et des cellules à gobelets dans l'épithélium intestinal. Le traitement avec l'une ou l'autre des probiotiques des genre *Lactobacillus* a empêché l'altération histo-pathologique du tissu intestinal des animaux atteints d'allergie alimentaire. Cet effet bénéfique des probiotiques pourrait être à l'origine de la diminution de la sévérité de la diarrhée (**Enokida et al., 2022**).

McCallan et ses collaborateurs ont démontré un lien étroit entre les lésions intestinales et les manifestations gastro-intestinales chez les enfants atteints d'allergie alimentaire (**McCalla et al., 1980**). Il a été rapporté que les souris surexprimant l'IL-5 augmentaient le nombre

d'éosinophiles gastro-intestinaux, l'accumulation se produisait dans la *lamina propria*, la sous-muqueuse et les villosités (**Mishra et al., 2002**). En outre, l'IL-10 produite dans l'intestin par les cellules inflammatoires provoque une augmentation de la quantité d'éosinophiles et de mastocytes, ainsi qu'une hyperplasie des cellules de gobelet (**Tulyeu et al., 2019**).

D'autres études ont montré que les protéines de la couche S (Slp) à la surface de certaines souches de *Lactobacillus* présentaient une bioactivité qui pouvait renforcer l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales (CEI). Les Slp de *L. acidophilus* NCFM pourraient augmenter l'expression de Claudin-1 et inhiber la diminution de la résistance électrique transépithéliale et l'augmentation de la perméabilité intestinale (**Wang et al., 2019**).

Les probiotiques peuvent également réguler les signaux inflammatoires des CEI. Le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et la protéine kinase activée par les mitogènes kinases (MAPK) sont deux voies inflammatoires importantes. Des études ont montré que les probiotiques peuvent inhiber l'activation du facteur nucléaire NF- κ B. *L. plantarum* AR113 était capable d'inhiber IL-1 β , IL-6 et TNF- α et d'augmenter l'expression des cytokines liées à l'anti-inflammation, telles que l'IL-10, chez les souris atteintes de colite. L'expression de NF- κ B/TLR4/facteur de différenciation myéloïde 88 était également réduite. Les vésicules extracellulaires de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 contiennent du SlpB, qui pourrait jouer un rôle de médiateur dans les réponses inflammatoires en régulant l'activité du facteur de transcription NF- κ B. On a supposé que Slp pourrait être la clé de la régulation de l'activation de NF- κ B (ex. l'activation de NF- κ B) (**Gu et al., 2023**).

L. plantarum isolé du kimchi pourrait réduire l'infiltration et l'activation des mastocytes chez les souris sensibilisées à l'OVA et inhiber de manière significative l'expression du gène GATA3 des cytokines liées à Th2 (telles que IL-4, IL-5 et IL-13) dans l'intestin grêle (**Hyung et al., 2016**).

Nous avons également trouvé que les probiotiques peuvent réguler l'hypersensibilité à l'ovalbumine en modifiant la composition du microbiote intestinal comparés aux témoins, en termes d'abondance relative des LAB, des bactéries non spécifiques et des espèces de *Clostridia*. Les bactéries probiotiques que nous avons testées étaient capables de moduler la composition de la flore microbienne chez tous les rats traités aux probiotiques. De même, **Abdel-Gadir et al. (2019)** ont récemment rapporté que l'immunisation allergénique dans un modèle d'allergie alimentaire induisait de profonds changements dans la composition du microbiome intestinal.

IV.5. Conclusion

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui peuvent réguler le système immunitaire de l'hôte et lui être bénéfiques lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante. Les principales fonctions des probiotiques sont de maintenir l'équilibre du microbiote intestinal et de réguler le système immunitaire, ce qui peut atténuer l'inflammation et les maladies chroniques.

De plus en plus des études ont montré que le nombre et les espèces du microbiote intestinal pourraient intervenir dans les allergies alimentaires. C'est pourquoi les effets des probiotiques sur les allergies alimentaires font l'objet d'une attention croissante.

Les probiotiques peuvent réguler le système immunitaire en interagissant avec les lymphocytes, le microbiote intestinal et les métabolites basés sur le système immunitaire de la muqueuse intestinale. Bien que de nombreuses expériences sur les animaux montrent que les probiotiques jouent un rôle important dans l'atténuation des allergies alimentaires, leurs effets cliniques sont encore controversés.

Étant donné que l'apparition d'une allergie alimentaire est influencée par de nombreux facteurs, tels que la propreté du cadre de vie, la génétique familiale, la structure du régime alimentaire, il existe de grandes différences entre les différents patients, ce qui entraîne de grandes difficultés dans l'application clinique des probiotiques et pose de nouveaux défis pour le choix efficace des probiotiques. En outre, la durée d'administration des probiotiques affectera également le traitement de l'allergie alimentaire. Par conséquent, des études supplémentaires sur l'application clinique des probiotiques sont fortement nécessaires

Conclusion générale

Comme le monde continue de constater une augmentation des taux d'allergies alimentaires qui ne peut être uniquement expliquée par l'effet génétique, il est de plus en plus important d'identifier des mécanismes de sensibilisation qui sont motivés par l'instauration d'une démarche diététique basée sur un microbiote sain.

Il a été démontré que le microbiote intestinal jouait un rôle important dans les allergies alimentaires en induisant une protection contre la sensibilisation. Ceci est évident dans les études menées chez des souris sans germes qui développent une anaphylaxie sévère et qui peut être atténuée par la colonisation de microbes simples ou de communautés complexes de bactéries. En outre, des études sur des souris utilisant des régimes riches en matières grasses ou faibles en fibres ont montré que les changements du microbiote intestinal provoqués par l'alimentation étaient associés à la sensibilisation aux allergies alimentaires. Néanmoins, on sait peu sur les liens de causalité entre la sensibilisation des allergies alimentaires et des membres spécifiques du microbiome, et comment certains microbes régulent les réponses allergiques.

Dans le contexte des allergies alimentaires, une barrière épithéliale fonctionnelle a été démontrée comme étant cruciale pour prévenir la sensibilisation et promouvoir la tolérance orale.

Une partie importante de la barrière muqueuse intestinale est la couche de mucus, qui sert de première ligne de défense dans l'intestin pour prévenir l'invasion microbienne mais aussi pour permettre l'absorption des nutriments. Bien que l'exposition intestinale aux allergènes soit comprise comme une immunotolérance dans un intestin sain, une dégradation de la tolérance peut se produire lorsque la couche muqueuse est génétiquement ablatée du principal constituant du mucus. L'induction de la tolérance dans l'intestin par l'intermédiaire des cellules T régulatrices est médiée par les cellules dendritiques locales, soulignant l'importance de la barrière muqueuse dans les allergies alimentaires.

L'allergie alimentaire est reconnue comme un problème important de santé publique et de sécurité alimentaire, car elle se manifeste par une réaction immunitaire amplifiée aux antigènes alimentaires. Récemment, les probiotiques des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* d'origine intestinale ont été présentés comme une stratégie prometteuse contre les maladies allergiques en modulant l'équilibre des réponses Th1/Th2. Toutefois, les effets antiallergiques des souches probiotiques d'origine lait humain sont inconnus. Cette étude a donc

examiné le potentiel d'une souche isolée du lait humain (SL42) d'une maman en bonne santé, comparée à la fameuse souche probiotique

L'objectif de cette présente étude était de mettre en évidence l'effet de deux souches de bactéries lactiques d'origine humaine qui sont : *L. reuteri* DSM 17938 et *L. rhamnosus* SL42 sur l'expression de l'allergie alimentaire à la caséine de lait ou à l'ovalbumine d'œuf chez le rat Wistar en âge juvénile.

Les deux protocoles *in-vivo* réalisés ont montré d'abord, que l'hypersensibilité aux protéines d'origine animale n'a pas les mêmes effets sur le rat Wistar. L'ovalbumine provoque de graves symptômes et de profondes atteintes comparée à la caséine de lait concentrée. Ensuite, nous avons démontré qu'il est possible de soulager ou diminuer ces symptômes par l'administration orale des probiotiques.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence un potentiel candidat probiotique : *Lactobacillus rhamnosus*. Cet isolat a reflété une très bonne résistance aux hostilités digestives et un bon pouvoir d'assimilation du cholestérol. De même, les activités antimicrobiennes exprimées laissent pondérer son antagonisme potentiel vis-à-vis de pathogènes responsables de diverses maladies sérieuses chez l'homme et prédire son utilisation future comme probiotique dans la prise en charge des infections digestives.

Le côté sécuritaire a été aussi évoqué quand nous avons trouvé que la souche était sensible à la pénicilline, au chloramphénicol et intermédiairement sensible à l'amoxicilline.

Les expériences d'induction de l'allergie alimentaire sur le raton Wistar ont été proposées comme une possible extrapolation depuis un modèle murin vers l'homme en bas d'âge. L'induction de l'allergie a été réalisée par voie orale mimant le comportement normal chez l'humain et en dehors de toute « excitation » aidante de la part des substances adjuvantes. Le rat Wistar est un bon modèle animal pour étudier l'allergie alimentaire parce qu'il a été capable d'induire la synthèse d'anticorps spécifiques, en particulier les IgE.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que SL42 exerce des effets d'atténuation de l'allergie alimentaire induites par la CAS ou l'OVA sur les ratons.

Bien que nous ayons enregistré des différences dans les niveaux expressions chez les ratons sensibilisés à la CAS ou à l'OVA, la souche SL42 ou la souche probiotique DSM 17897 étaient les deux derrière une inhibition des réponses immunitaires Th2 jéjunales et la modulation de la composition du microbiome intestinal.

Cette étude fournit une preuve solide que les deux bactéries lactiques probiotiques sont tolérogènes, c.-à-d. capables de s'implanter dans le tube digestif des rats Wistar afin d'exercer leurs effets immuno-modulateurs contre l'hypersensibilité à la caséine ou à l'ovalbumine, et de réguler de manière significative les manifestations gastro-intestinales, histo-pathologiques ainsi que la dysbiose du microbiote intestinal.

Reference

1. A.S. Mirchandani, A.G. Besnard, E. Yip, C. Scott, C.C. Bain, V. Cerovic, R.J. Salmond, F.Y. Liew. *J. Immunol.*, 192 (2014), pp. 2442-2448.
2. Abbas, M.; Moussa, M.; Akel, H. Type I Hypersensitivity Reaction. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021. [Google Scholar]
3. Abdel-Gadir A, Stephen-Victor E, Gerber GK, Noval Rivas M, Wang S, Harb H, Wang L, Li N, Crestani E, Spielman S, Secor W, Biehl H, DiBenedetto N, Dong X, Umetsu DT, Bry L, Rachid R, Chatila TA. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat Med.* 2019 Jul;25(7):1164-1174. doi: 10.1038/s41591-019-0461-z. Epub 2019 Jun 24. Erratum in: *NatMed.* 2019 Sep;25(9):1458. PMID: 31235962; PMCID: PMC6677395.
4. Abdel-Gadir, A.; Stephen-Victor, E.; Gerber, G., Rivas, MN.; Wang, S.; Harb, H.; Wang, H.; Li, N.; Crestani, E.; Spielman, S.; Secor, W.; et al., Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat. Med.* 25, 1164–1174 (2019).
5. Acharya M, Borland G, Edkins AL, Maclellan LM, Matheson J, Ozanne BW, et al. CD23/Fc ϵ RII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol* 2010;162(1):12–23.
6. Aldemir, H., Bars, R., and Herouet-Guicheney, C. 2009. Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regul. Toxicol. Pharm.* 54:S52–S57.
7. Ali, A., Tan, H., & Kaiko, G. E. (2020). Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Frontiers in Immunology*, 11, 604054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604054>
8. An, S. B., Yang, B. G., Jang, G., Kim, D. Y., Kim, J., Oh, S. M., & Jang, M. H. (2022). Combined IgE neutralization and *Bifidobacterium longum* supplementation reduces the allergic response in models of food allergy. *Nature Communications*, 13(1), 5669. *Animal Science Journal*, 91 (2020), Article e13357, [10.1111/asj.13357](https://doi.org/10.1111/asj.13357).
9. Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AMH, Selvi Naicker A, Ismail OHR, Athi Kumar RK, Lokanathan Y. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 13;21(20):7533. doi: 10.3390/ijms21207533. PMID: 33066029; PMCID: PMC7589539.
10. Anvari S, Miller J, Yeh CY, Davis CM. IgE-Mediated Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019 Oct;57(2):244-260. doi: 10.1007/s12016-018-8710-3. PMID: 30370459.
11. Aquilante, B. P., Castro, A. P. B. M., Yonamine, G. H., De Barros Dorna, M., Barp, M. F., Martins, T. P. D. R., & Pastorino, A. C. (2023). IgE-mediated cow's milk allergy in Brazilian children: Outcomes of oral food challenge. *World Allergy Organization Journal*, 16(5), 100781. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2023.100781>
12. Arock, M. (2004) Similitudes et différences entre les mastocytes et le polynucléaire basophile. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 44, 23-36.
13. Arrieta, M.C., Stiemsma, L.T., Dimitriu, P.A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M.J., Britton, H.M., Lefebvre, D.L., et al.; CHILD Study Investigators (2015). Early infancy microbial

- and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra152.
14. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232–236.
 15. 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.
 16. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014 Jan 4;383(9911):69-82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7. Epub 2013 Jul 26. PMID: 23890997; PMCID: PMC4380133.
 17. Attia, A., Boubidi, A., Bachtarzi, M., Khelfi, H., Téliidji, Z., & Benyounes, A. (2020). Induction de tolérance orale (ITO) aux aliments : Expérience algérienne. *Revue Française D'Allergologie*, 60(4), 312-313. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2020.02.036>
 18. Azad, M.B., Konya, T., Guttman, D.S., Field, C.J., Sears, M.R., HayGlass, K.T., Mandhane, P.J., Turvey, S.E., Subbarao, P., Becker, A.B., et al.; CHILD Study Investigators (2015). Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin. Exp. Allergy* 45, 632–643.
 19. Azuh DE, Azuh AE, Iweala EJ, Adeloje D, Akanbi M, Mordi RC. Factors influencing maternal mortality among rural communities in southwestern Nigeria. *Int J Womens Health.* 2017 Apr 10;9:179-188. doi: 10.2147/IJWH.S120184. PMID: 28442936; PMCID: PMC5396940.
 20. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002 Sep 19;347(12):911-20. doi: 10.1056/NEJMra020100. PMID: 12239261.
 21. Baker MG, Sampson HA. Phenotypes and endotypes of food allergy: A path to better understanding the pathogenesis and prognosis of food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018 Mar;120(3):245-253. doi: 10.1016/j.anai.2018.01.027. PMID: 29378246.
 22. Baldassarre ME, Laforgia N, Fanelli M, Laneve A, Grosso R, Lifschitz C. Lactobacillus GG improves recovery in infants with blood in the stools and presumptive allergic colitis compared with extensively hydrolyzed formula alone. *J Pediatr.* 2010;156(3):397–401.
 23. Ballesteros-Tato, A. et al. T follicular helper cell plasticity shapes pathogenic T helper 2 cell-mediated immunity to inhaled house dust mite. *Immunity* 44, 259–273 (2016).
 24. Bao, Z., Chen, Z., Lu, S., Wang, G., Qi, Z., & Cai, Z. (2021). Effects of hydroxyl group content on adsorption and desorption of anthracene and anthrol by polyvinyl chloride microplastics. *Science of The Total Environment*, 790, 148077. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148077>.
 25. Berin, M.C.; Sampson, H. Mucosal Immunology of Food Allergy. *Curr. Biol.* 2015, 23, R389–R400. [CrossRef]
 26. Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, et al. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Sci Rep* 2018; 8:12500.
 27. Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA. Effect of

- cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1077–81.
28. Bidat E, Rancé F, Baranès T, Goulamhousen S. L'allergie au lait de chèvre ou de brebis chez l'enfant, sans allergie au lait de vache. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006;43:273–7.
 29. Boughellout H, Benatallah L, Zidoune MN. Prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache chez des enfants âgés de moins de 3 ans de la ville de Constantine (Algérie). *Rev Fr Allergol* 2015;55:288–92.
 30. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Nutr Res.* 2010;31(1):61–75.
 31. Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(11):1666–77. doi: 10.1172/JCI19785. PMID: 1466074 3; PMCID: PMC281649.
 32. Brough HA, Nadeau KC, Sindher SB, Alkotob SS, Chan S, Bahnson HT, et al. Epicutaneous sensitization in the development of food allergy: what is the evidence and how can this be prevented? *Allergy.* (2020) 75:2185–205. doi: 10.1111/all.14304
 33. Brunekreef B., Von Mutius E., Won G., Odhiambo, J., García-Marcos L., Foliaki S., ISAAC Phase Three Study Group. Exposure to cats and dogs, and symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 2012, 23(5): 742–750.
 34. Bunyavanich, S., Shen, N., Grishin, A., Wood, R., Burks, W., Dawson, P., Jones, S.M., Leung, D.Y., Sampson, H., Sicherer, S., and Clemente, J.C. (2016). Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1122–1130.
 35. Bunyavanich, S., Shen, N., Grishin, A., Wood, R., Burks, W., Dawson, P., Jones, S. M., Leung, D. Y., Sampson, H., Sicherer, S., & Clemente, J. C. (2016). Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(4), 1122-1130. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.041>.
 36. Buxeraud, J., Faure, S., Guerriaud, M., Eskenazy, D., Sergheraert, L., & Bruley Des Varannes, S. (2021). Un nouveau règlement pour les dispositifs médicaux à base de substances. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(602), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.11.012>
 37. Buxton, R. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. 2005. Available online: <https://www.asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba072aea25a43e76/protocol2885.pdf> (accessed on 19 November 2019).
 38. Cabanillas, B., Maleki, S.J., Cheng, H., and Novak, N. (2018). Differences in the Uptake of Ara h 3 from Raw and Roasted Peanut by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 177, 35–39.
 39. Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe.* 2013 Nov 13;14(5):559-70. doi: 10.1016/j.chom.2013.10.004. PMID: 24237701; PMCID: PMC4049278.
 40. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015

- Oct;11(10):577-91. Do i: 10.1038/nrendo.2015.128. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26260141.
41. Castan L., Colas L., Bouchau G., Bodinier M., Barbarot S., Magnan A. Hypothèse hygiéniste : où en est-on ? Compte rendu de l'atelier « Allergies » du xvii DHU 2020 « Médecine personnalisées des maladies chroniques ». *Revue Française d'Allergologie*, 2016, 56(4): 364–371.
 42. Caubet JC, Wang J. Current understanding of egg allergy. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Apr;58(2):427-43, xi. doi: 10.1016/j.pcl.2011.02.014. PMID: 21453811; PMCID: PMC3069662.
 43. Cezmi A. Akdis, Ioana Agache. European Academy of Allergy and Clinical ... European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2014. Length, 388 pages.
 44. Chinthrajah, R. S., Hernandez, J. D., Boyd, S. D., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 984-997.
 45. Copy
 46. Dano D, Dreyer L; Kanny G; Astier C. Reactogenic threshold of yellow pea compared to other legumes. *Allergy*. 2014;69:253
 52. gaml, A., El-Mesery, M., Sultan, S., Ahmed, T. A. E., Gomaa, A. I., et al. (2021). Changes of gut-microbiota-liver axis in hepatitis c virus infection. *Biology (Basel)* 10:55. doi: 10.3390/biology10010055.
 53. Enokida, M., Minato, K., Yoshino, S., Ohto, N., Kuwahara, H., & Mizuno, M. (2022). Oral administration of *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3 exerts anti-allergic activity against intestinal food allergy mouse models sensitized and challenged with ovalbumin. *Food*
 47. Datema MR, Eller E, Zwinderman AH, Poulsen LK, Versteeg SA, van Ree R, et al. Ratios of specific IgG4 over IgE antibodies do not improve prediction of peanut allergy nor of its severity compared to specific IgE alone. *Clin Exp Allergy*. (2019) 49:216–26. doi: 10.1111/cea.13286
 48. Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2009). Modulation nutritionnelle de la flore intestinale : Une nouvelle approche diététique dans la prise en charge de l'obésité ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(1), 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2009.01.001>.
 49. Ege, M. J., M. Mayer, A. C. Normand, J. Genuneit, W. O. Cookson, C. Braun-Fahrlander, D. Heederik, R. Piarroux, E. von Mutius & G. T. S. Group (2011) Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*, 364, 701-9.
 50. Eigenmann, P. A. (2000). Diagnosis of IgE-mediated food allergy among Swiss children with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 11(2), 95-100. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3038.2000.00071.x>.
 51. El-Mowafy, M., El Bioscience, 47, 101785. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101785>
 54. Escobedo-de la Peña, J., Rascón-Pacheco, R. A., de Jesús Ascencio-Montiel, I., González-Figueroa, E., Fernández-Gárate, J. E., Medina-Gómez, O. S., ... & Borja-Aburto, V. H. (2021). Hypertension, diabetes and obesity, major risk factors for death in patients with COVID-19 in Mexico. *Archives of medical research*, 52(4), 443-449.

55. Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, et al. Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 2018; 73:1515–1524.
56. Feary, J., J. Britton & J. Leonardi-Bee (2011) Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 66, 569-78.
57. Feehley, T., Plunkett, C. H., Bao, R., Choi Hong, S. M., Culleen, E., Campbell, E., Aitoro, R., Nocerino, R., Paparo, L., Andrade, J., Antonopoulos, D. A., Berni Canani, R., & Nagler, C. R. (2019). Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature Medicine*, 25(3), 448-453. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0324-z>
58. Fishbein, A.B.; Silverberg, J.I.; Wilson, E.J.; Ong, P.Y. Update on atopic dermatitis: Diagnosis, severity assessment, and treatment selection. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2020, 8, 91–101. [CrossRef] [PubMed]
59. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Sep 4;9(10):577-89. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156. PMID: 22945443.
60. Fontana, L.; Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Muñoz-Quezada, S.; Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 2013, 2, S35–S50. [CrossRef] [PubMed]
61. Frampton J, Murphy KG, Frost G, Chambers ES. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab.* 2020 Sep;2(9):840-848. doi: 10.1038/s42255-020-0188-7. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32694821.
62. Frossard, C.P., Troupia, 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.
63. Galli E, Meglio P, Giampietro PG, Gianni S. Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy—follow-up at 4 yr and 8 months. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008 ; 19(5):412-9.
64. Gao, Y.; Nanan, R.; Macia, L.; Tan, J.; Sominsky, L.; Quinn, T.P.; O'Hely, M.; Ponsonby, A.L.; Tang, M.L.K.; Collier, F.; et al. The maternal gut microbiome during pregnancy and offspring allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021, 148, 669–678. [CrossRef] [PubMed]
65. Garcia-Larsen V, Del Giacco SR, Moreira A, Bonini M, Charles D, Reeves T, Carlsen KH, Haahtela T, Bonini S, Fonseca J, Agache I, Papadopoulos NG, Delgado L. Asthma and dietary intake: an overview of systematic reviews. *Allergy.* 2016 Apr;71(4):433-42. doi: 10.1111/all.12800. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26505989.
66. Gargano, D.; Appanna, R.; Santonicola, A.; De Bartolomeis, F.; Stellato, C.; Cianferoni, A.; Casolaro, V.; Iovino, P. Food Allergy and Intolerance: A Narrative Review on Nutritional Concerns. *Nutrients* 2021, 13, 1638. <https://doi.org/10.3390/nu13051638>.
67. Gerber, G. K., Noval Rivas, M., Wang, S., Harb, H., Wang, L., Li, N., Crestani, E., Spielman, S., Secor, W., Biehl, H., DiBenedetto, N., Dong, X., Umetsu, D. T., Bry, L., Rachid, R., & Chatila, T. A. (2019). Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nature Medicine*, 25(7), 1164-1174. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0461-z>
68. Gerber, G. K., Noval Rivas, M., Wang, S., Harb, H., Wang, L., Li, N., Crestani, E., Spielman, S., Secor, W., Biehl, H., DiBenedetto, N., Dong,

- X., Umetsu, D. T., Bry, L., Rachid, R., & Chatila, T. A. (2019). Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nature Medicine*, 25(7), 1164-1174. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0461-z>
69. Gray, C.L. Food Allergy in South Africa. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2017, 17, 668. [CrossRef] [PubMed]
70. Gu, S., Yang, D., Liu, C., & Xue, W. (2023). The role of probiotics in prevention and treatment of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, 12(3), 681-690.
71. Gupta, R.S., Springston, E.E., Warrier, M.R., Smith, B., Kumar, R., Pongratic, J., and Holl, J.L. (2011). The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics* 128, e9–e17.
72. Gupta, R.S., Warren, C.M., Smith, B.M., Jiang, J., Blumenstock, J.A., Davis, M.M., Schleimer, R.P., and Nadeau, K.C. (2019). Prevalence and Severity of Food Allergies Among US Adults. *JAMA Netw. Open* 2, e185630.
73. Haitao Ma, Yuan Qiu, corresponding author and Hua Yang corresponding. (2020). Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. doi: 10.1002/JLB.3RU0220-111.
74. Han, HAN, Fang, et ZHANG, Cun-hui. Transelliptical graphical models. *Advances in neural information processing systems*, 2012, vol. 25.
75. Hendaus M.A., Jomha F.A., Ehlayel M. Allergic diseases among children: nutritional prevention and intervention. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2016, 12: 361–372.
76. Hernandez, J. D.; Galli, S. J Reber, L. L. The pathophysiology of anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 335–348 (2017).
77. Hink, T.; Burnham, C.A.; Dubberke, E.R. A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. *Anaerobe* 2013, 19, 39–43. [CrossRef]
78. Hirata W, Tomoda T, Yuri S, Isotani A. Generation of the Y-chromosome linked red fluorescent protein transgenic mouse model and sexing at the preimplantation stage. *Exp Anim.* 2022 Feb 9;71(1):82-89. doi: 10.1538/expanim.21-0119. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34544911; PMCID: PMC8828399.
79. Hori, T., Kiyoshima, J., Yasui, H., 2003. Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 420–422.
80. Hruz P. Epidemiology of eosinophilic esophagitis. *Dig Dis.* 2014;32(1-2):40-7. doi: 10.1159/000357008. Epub 2014 Feb 28. PMID: 24603379.
81. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 2013 Dec 19;155(7):1451-63. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24315484; PMCID: PMC3897394.
82. Huang J, Liu C, Wang Y, Wang C, Xie M, Qian Y, Fu L, Application of in vitro and in vivo models in the study of food allergy, *Food Science and Human Wellness* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.10.002>
83. Huang, C.H.; Cheng, J.; Deng, M.C.; Chou, C.H.; Jan, T.R. Prebiotic effect of diosgenin, an immunoactive steroidal sapogenin of the Chinese yam. *Food Chem.* 2012, 132, 428–432. [CrossRef] [PubMed]

84. Huligere, S. S., Alotaibi, G., Al Mouslem, A. K., Bahaiddin, A. A., Shivanandappa, T. B., & Ramu, R. (2023). Antidiabetic Activity of Potential Probiotics *Limosilactobacillus* spp., *Levilactobacillus* spp., and *Lacticaseibacillus* spp. Isolated from Fermented Sugarcane Juice: A Comprehensive In Vitro and In Silico Study. *Nutrients*, 15(8), 1882. <https://doi.org/10.3390/nu15081882>
85. Ibsaine, O., Djenouhat, K., Lemdjadani, N., Arrada, Z., & Berrah, H. (2014). SFP P-137 – Etude cas témoins des facteurs de risque de l'APLV IgE-médiée. *Archives de Pédiatrie*, 21(5), 847. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(14\)72107-4](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(14)72107-4)
86. Inuo C, Tanaka K, Suzuki S, Nakajima Y, Yamawaki K, Tsuge I, et al. Oral Immunotherapy Using Partially Hydrolyzed Formula for Cow's Milk Protein Allergy: A Randomized, Controlled Trial. *Int Arch Allergy Immunol* (2018) 177:259–68. doi: 10.1159/000490804.
87. ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) ISAAC Handbook, 2016
88. J. Haydersah, I. Chevallier, I. Rochette, C. Mouquet-rivier, C. Picq, Fermentation by Amylolytic Lactic Acid Bacteria and Consequences for Starch Digestibility of Plantain , Breadfruit , and Sweet Potato Flours, *J. Food Sci.* 77 (2012) 466–472, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02811.x>.
89. J. Lamubol, N. Ohto, H. Kuwahara, M. Mizuno *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3-induced TGF- β 1 secretion from intestinal epithelial cells stimulated CD103+DC and Foxp3+Treg differentiation and amelioration of colitis in mice *Food & Function*, 12 (2021), pp. 8044-8055, 10.1039/D1FO00990G
90. 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* 1950 179, 3515–3523.
91. Jennewein MF, Abu-Raya B, Jiang Y, Alter G, Marchant A. Transfer of maternal immunity and programming of the newborn immune system. *Semin Immunopathol.* 2017 Nov;39(6):605-613. doi: 10.1007/s00281-017-0653-x. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28971246.
92. Jensen, S.A.; Fiocchi, A.; Baars, T.; Jordakieva, G.; Nowak-Wegrzyn, A.; Pali-Schöll, I.; Passanisi, S.; Pranger, C.L.; Roth-Walter, F.; Takkinen, F.; et al. Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines update-III-Cow's milk allergens and mechanisms triggering immune activation. *World Allergy Organ. J.* 2022, 15, 100668. [CrossRef]
93. K.E. Hyung, B.S. Moon, B. Kim, et al., *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi suppress food allergy by modulating cytokine production and mast cells activation, *J. Funct. Food* 29 (2017) 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.016>.
94. Kalb LG, Singh V, Hong JS, Hologue C, Ludwig NN, Pfeiffer D, Reetzke R, Gross AL, Landa R. Analysis of Race and Sex Bias in the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS-2). *JAMA Netw Open.* 2022 Apr 1;5(4):e229498. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.9498. PMID: 35471566; PMCID: PMC9044110.
95. Kamel El MecherfiKamel, El Mecherfi Roberta, Lupi Roberta Lupi M. De Albuquerque Show. *Lactococcus lactis* LLGCK18 : une bactérie lactique qui réduit l'antigénicité et

- l'allergénicité du gluten April 2021 Nutrition Clinique et Metabolisme 35(1):63 DOI: 10.1016/j.nupar.2021.01.088 Conference: Journées Francophones de Nutrition.
96. Kanagaratham C, Sallis BF, Fiebiger E. Experimental Models for Studying Food Allergy. Cellular Journal Pre-proof and molecular gastroenterology and hepatology. 2018;6(3):356-69.e1.
 97. Kim JL, Brisman J, & al Trends in the prevalence of asthma, rhinitis, and eczema in 15-year-old adolescents over an 8-year period. Respiratory Medicine, 2014;108, 701-708. Doi: org/10.1016/j.rmed.2014.02.011.
 98. Kim SY, Sim S, Park B, Jin-Hwan K, Choi HG (2016) High-fat and low carbohydrate diets are associated with allergic rhinitis but not asthma or atopic dermatitis in children. PloS One 11: e0150202.
 99. Klaenhammer T.R. et Green. Functional activities of Lactobacillus probiotics: genetic mandate. Int. Dairy J., 8 (1998), pp. 497-506.
 100. Kolopp-Sarda, M. N., D. A. Moneret-Vautrin, B. Gobert, G. Kanny, M. Brodschii, M. C. Bene, and G. C. Faure. 1997. Specific humoral immune responses in 12 cases of food sensitization to sesame seed. Clin. Exp. Allergy 27:1285-1291.
 101. Kotlyar DS, Shum M, Hsieh J, et al. Non-pulmonary allergic diseases and inflammatory bowel disease: a qualitative review. World J Gastroenterol 2014;20:11023-11032.
 102. Labrosse, R.; Graham, F.; Caubet, J.C. Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Allergies in Children: An Update. Nutrients 2020, 12, 2086. [CrossRef]
 103. Larssen, P., Wik, L., Czarnewski, P., Eldh, M., Löf, L., Ronquist, K. G., ... & Kamali-Moghaddam, M. (2017). Tracing cellular origin of human exosomes using multiplex proximity extension assays. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(3), 502-511
 104. Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. J Allergy Clin Immunol 2015; 129:1579-1587. doi: 10.1016/j.jaci.2012.04.009 PMID: 22554705.
 105. Li, Y., Zheng, Q., Bao, C., Li, S., Guo, W., Zhao, J., ... & Huang, S. (2015). Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell research*, 25(8), 981-984.
 106. Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science, 147, 747-748. <https://doi.org/10.1126/>
 107. Liu, Q., Wu, J. e., Lim, Z. Y., Aggarwal, A., Yang, H., & Wang, S. (2017). Evaluation of the metabolic response of Escherichia coli to electrolysed water by 1H NMR spectroscopy. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-Food Science and Technology, 79, 428-436.
 108. Lo Presti, A., Zorzi, F., Del Chierico, F., Altomare, A., Cocca, S., Avola, A., et al. (2019). Fecal and mucosal microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. Front. Microbiol. 10:1655.
 109. Loh PR, Genovese G, Handsaker RE, Finucane H K, Reshef YA, Palamara PF, Birmann BM, Talkowski ME, Bakhoun SF, McCarroll SA, Price AL. Insights into clonal haematopoiesis from 8,342 mosaic chromosomal alterations. Nature. 2018 Jul;559(7714):350-355. doi: 10.1038/s41586-018-0321-x. Epub 2018 Jul 11. PMID: 29995854; PMCID: PMC6054542.
 110. Lortal, S., El Mecherfi, K., Mariotti, F., Eutamène, H., Rul, F., Champomier-Vergès, M., & Savary-Auzeloux, I. (2020). Aliments fermentés & bénéfiques santé : Un défi pour la

- recherche. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(3), 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2020.02.004>
- 111.** Łubiech K, Twarużek M. Lactobacillus Bacteria in Breast Milk. *Nutrients*. 2020 Dec 10;12(12):3783. doi: 10.3390/nu12123783. PMID: 33321792; PMCID: PMC7764098.
- 112.** Lund, S. Walford, H. H. & Doherty, T. A. Type 2 innate lymphoid cells in allergic disease. *Curr. Immunol. Rev.* 9, 214–221 (2013).
- 113.** Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, Clark AT; Standards of Care Committee (SOCC) of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI). BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):642-72. doi: 10.1111/cea.12302. PMID: 24588904.
- 114.** M Cecilia Berin , Charuta Agashe , A Wesley Burks, David Chiang , Wendy F Davidson , Peter Dawson , Alexander Grishin , Alice K Henning , Stacie M Jones , Edwin H Kim , Donald Y M Leung , Madhan Masilamani , Amy M Scurlock , Scott H Sicherer , Robert A Wood , Hugh A Sampson. (2021). Allergen-specific T cells and clinical features of food allergy: Lessons from CoFAR immunotherapy cohorts. doi: 10.1016/j.jaci.2021.09.029.
- 115.** M. Mizuno, N. Ohto, H. Kuwahara Lactiplantibacillus plantarum 22A-3 isolated from pickle suppresses ovalbumin-induced food allergy in BALB/c mice and 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132 (2021), pp. 271-278, 10.1016/j.jbiosc.2021.05.001
- 116.** Ma, J., Zhang, J., Li, Q., Shi, Z., Wu, H., Zhang, H., Tang, L., Yi, R., Su, H., & Sun, X. (2019). Oral administration of a mixture of probiotics protects against food allergy via induction of CD103+ dendritic cells and modulates the intestinal microbiota. *Journal of Functional Foods*, 55, 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.010>
- 117.** Madsen CB, Hattersley S, Allen KJ, Beyer K, Chan CH, Godefroy SB, et al. Can We Define a Tolerable Level of Risk in Food Allergy? Report from a EuroPrevall/UK Food Standards Agency workshop. *Clin Exp Allergy* (2012) 42(1):30–7. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03868.x
- 118.** Magnusson, M. K., Isaksson, S., and Ohman, L. (2020). The anti-inflammatory immune regulation induced by butyrate is impaired in inflamed intestinal mucosa from patients with ulcerative colitis. *Inflammation* 43, 507–517. doi: 10.1007/s10753-019-01133-8.
- 119.** Malveaux, F. J., M. C. Conroy, N. F. Adkinson & L. M. Lichtenstein (1978) IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J Clin Invest*, 62, 176-81.
- 120.** Manus, J. (2023). Décolonisation de la flore intestinale pathogène, probiotique plutôt qu'antibiotique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2023(551), 10. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(23\)00068-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(23)00068-0)
- 121.** Matib, Lynda; Hadeif, Meriem; Boukhedena, Nadjah; Alioua, S. (Encadreur). Propriétés probiotiques des bactéries lactiques du lait maternel et de la flore intestinale des nourrissons ; <http://dspace.univ-ijjel.dz:8080/xmlui/handle/123456789/7039>
Date: 2020-10-05
- 122.** Mazzocchi A., Venter C., Maslin K., Agostoni C. The Role of Nutritional Aspects in Food Allergy: Prevention and Management. *Nutrients*. 2017, 9(8).
- 123.** McCalla, R.; Savilahti, E.; Perkkiö, M.; Kuitunen, P.; Backman, A. Morphology of the

- Jejunum in Children with Eczema due to Food Allergy. *Allergy* 1980, 35, 563–571. [CrossRef]
- 124.** Mei C, van der Gaag M, Nelson B, Smit F, Yuen HP, Berger M, Krcmar M, French P, Amminger GP, Bechdorf A, Cuijpers P, Yung AR, McGorry PD. Preventive interventions for individuals at ultra high risk for psychosis: An updated and extended meta-analysis. *Clin Psychol Rev.* 2021 Jun;86:102005. doi: 10.1016/j.cpr.2021.102005. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33810885.
- 125.** Mishra, A.; Hogan, S.P.; Brandt, E.B.; Wagner, N.; Crossman, M.W.; Foster, P.S.; Rothenberg, M.E. Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 4406–4412. [CrossRef]
- 126.** Mokhtari-Zaer, A., Saadat, S., Marefati, N., Hosseini, M., & Boskabady, M. H. (2020). Treadmill exercise restores memory and hippocampal synaptic plasticity impairments in ovalbumin-sensitized juvenile rats: Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Neurochemistry International*, 135, 104691. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104691>
- 127.** Muraro, A.; Halken, S.; Arshad, S.H.; Beyer, K.; Dubois, A.E.; Du Toit, G.; Eigenmann, P.A.; Grimshaw, K.E.; Hoest, A.; Lack, G.; et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy* 2014, 69, 590–601. [CrossRef].
- 128.** Na Sun , Cui Zhou , Qiankun Pu , Jing Wang , Kunlun Huang, and Huilian Che. *Journal of Immunotoxicology*, (2013). Allergic reactions compared between BN and Wistar rats after oral exposure to ovalbumin. DOI: 10.3109/1547691X.2012.693546
- 129.** Nanthakumar NN, Meng D, Newburg DS. Glucocorticoids and microbiota regulate ontogeny of intestinal fucosyltransferase 2 requisite for gut homeostasis. *Glycobiology* (2013) 23(10):1131–41. doi:10.1093/glycob/cwt050.
- 130.** Newburg DS, He Y. Neonatal Gut Microbiota and Human Milk Glycans Cooperate to Attenuate Infection and Inflammation. *Clin Obstet Gynecol.* 2015 Dec;58(4):814-26. doi: 10.1097/GRF.0000000000000156. PMID: 26457857.
- 131.** Noval Rivas M, Burton OT, Wise P, Zhang YQ, Hobson SA, Garcia Lloret M, Chehoud C, Kuczynski J, DeSantis T, Warrington J, Hyde ER, Petrosino JF, Gerber GK, Bry L, Oettgen HC, Mazmanian SK, Chatila TA. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Jan;131(1):201-12. doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.026. Epub 2013 Nov 30. PMID: 23201093; PMCID: PMC3860814.
- 132.** Ogrodowczyk, A.M.; Zakrzewska, M.; Romaszko, E.; Wróblewska, B. Gestational Dysfunction-Driven Diets and Probiotic Supplementation Correlate with the Profile of Allergen-Specific Antibodies in the Serum of Allergy Sufferers. *Nutrients* 2020, 12, 2381. [CrossRef]
- 133.** Okada, K.; Itoh, H.; et Ikemoto, M. Circulating S100A8/A9 is potentially a biomarker that could reflect the severity of experimental colitis in rats, 2020. *Heliyon*, Volume 6, Issue 2, February 2020, e03470. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03470>.
- 134.** Oriel, R.C., and Wang, J. (2019). Diagnosis and Management of Food Allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* 66, 941–954. Osborne, N.J., Koplin, J.J., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Lowe, A.J.,

- Matheson, M.C., Ponsonby, A.-L.L., Wake, M., Tang, M.L.K., Dharmage, S.C., et al. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 668-676.e2.
135. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol.* 2019 Mar 11;10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277. Erratum in: *Front Immunol.* 2019 Jun 28;10:1486. PMID: 30915065; PMCID: PMC6421268.
136. Patel N. Risk factors for adverse reactions during OIT. *Curr Treat Options Allergy* 2019;6:164–74.
137. Penagos, M., & Durham, S. R. (2022). Allergen immunotherapy for long-term tolerance and prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149(3), 802-811. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.01.007>
138. Pereira, D.I.; McCartney, A.L.; Gibson, G.R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties, 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (8), 4743–4752. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4743-4752.2003>
139. Pérez, PF. ; Minnaard, Y. ; Disalvo, EA. ; De Antoni, GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol*, 1998 Jan;64(1):21-6. doi: 10.1128/AEM.64.1.21-26.1998. PMID: 9435057; PMCID: PMC124666.
140. Perezábad L. Oral food desensitization in children with ige-mediated cow’s milk allergy: Immunological changes underlying desensitization. *Allergy Asthma Immunol Res* 2017;9(1):35–42.
141. Pilegaard, K.; and Madsen, C.; An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology.* 2004; 196:247–57. doi: 10.1016/j.tox.2003.11.010.
142. Plessas, S. ; Nouska, C. ; Karapetsas, A. ; Kazakos, S. ; Alexopoulos, A. ; Mantzourani, I. ; et al. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese, 2017. *Food Chemistry*, 226, 102–108
143. Potestio, L., Fornaro, L., Martora, F., Picone, V., Fabbrocini, G., & Marasca, C. (2022). Reply to Borgia et al. Comment on “Marasca et al. Tel edermatology and Inflammatory Skin Conditions during COVID-19 Era: New Perspectives and Applications. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 1511”. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/jcm11144244>.
144. Qiao, L., Dou, X., Song, X., Chang, J., Yi, H., & Xu, C. (2023). Targeting mitochondria with antioxidant nutrients for the prevention and treatment of postweaning diarrhea in piglets. *Animal Nutrition*, 15, 275-287. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.09.002>.
145. Rebeca Liébana-García , Marta Olivares , Carlos Francés-Cuesta, Teresa Rubio, Valerio Rossini, Guillermo Quintas, Yolanda Sanz. Intestinal group 1 innate lymphoid cells drive macrophage-induced inflammation and endocrine defects in obesity and promote insulinemia, *The Microbiome and FoodAllergy*, 2019. (University, City, State, Country); (Institute, City, State, Country). Personal communication, 2012.

146. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9351507. doi: 10.1155/2017/9351507. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29230419; PMCID: PMC5688358.
147. Ryan, F. J., Ahern, A. M., Fitzgerald, R. S., Laserna-Mendieta, E. J., Power, E. M., Clooney, A. G., et al. (2020). Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* 11:1512.
148. S.H. Sicherer et al. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management *J Allergy Clin Immunol* (2018).
149. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):805–19.63.
150. Sampson, H.A. (2005). Food allergy - Accurately identifying clinical reactivity. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, Supplement*, (Blackwell Munksgaard), pp. 19–24.
151. Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Jan;61(1). doi: 10.1002/mnfr.201600240. Epub 2016 Oct 10. PMID: 27500859.
152. Santos AF, James LK, Kwok M, McKendry RT, Anagnostou K, Clark AT, et al. Peanut oral immunotherapy induces blocking antibodies but does not change the functional characteristics of peanut-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* (2020) 145:440–443.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.005.
153. Sato, Y.;Yano, H.; Shimizu, Y., Tanaka, H.; Ohshima, T. Optic nerve input-dependent regulation of neural stem cell proliferation in the optic tectum of adult zebrafish, 2017. *Developmental Neurobiology* 77(4): 474-482.
154. Savage JS, Fisher JO, Birch LL. Parental influence on eating behavior: conception to adolescence. *J Law Med Ethics*. 2007 Spring;35(1):22-34. doi: 10.1111/j.1748-720X.2007.00111.x. PMID: 17341215; PMCID: PMC2531152.
155. Saviano, A.; Mattia Brigida, O.; Migneco, A.; Gunawardena, G.; Zanza, C.; Candelli, M.; Franceschi, F.; Ojetti, V. *Lactobacillus Reuteri* DSM 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in Diarrhea and Constipation: Two Sides of the Same Coin? *Medicina* 2021, 57, 643. [CrossRef]
156. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr*. 1997 Aug;66(2):515S-520S. doi: 10.1093/ajcn/66.2.515S. PMID: 9250141.
157. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr*. 1997 Aug;66(2):515S-520S. doi: 10.1093/ajcn/66.2.515S. PMID: 9250141.
158. Scurlock, A.M., & Jones, S.M. (2017). Advances in the approach to the patient with food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141 6, 2002-2014 .
159. Seda Sirin Kose. Outcomes of baked milk and egg challenge in cow's milk and hen's egg allergy: can tolerance be predicted with allergen-specific ige and prick- to-prick test? *Int Arch Allergy Immunol* 2019.
160. Sheridan MA, Zhao X, Fernando RC, Gardner L, Perez-Garcia V, Li Q, Marsh SGE, Hamilton R, Moffett A, Turco MY. Characterization of primary models of human trophoblast.

- Development. 2021 Nov 1;148(21):dev199749. doi: 10.1242/dev.199749. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34651188; PMCID: PMC8602945.
161. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:41-58.
 162. Silverberg JI., Simpson EL. Association between severe eczema in children and multiple comorbid conditions and increased healthcare utilization. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013 Aug;24(5):476-86. DOI: 10.1111/pai.12095.
 163. Simon D, Cianferoni A, Spergel JM, Aceves S, Holbreich M, Venter C, Rothenberg ME, Terreehorst I, Muraro A, Lucendo AJ, Schoepfer A, Straumann A, Simon HU. Eosinophilic esophagitis is characterized by a non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy*. 2016 May;71(5):611-20. doi: 10.1111/all.12846. Epub 2016 Feb 25. PMID: 26799684.
 164. Simpson, K. (2004). 'Doing development': The gap year, volunteer-tourists and a popular practice of development. *Journal of International Development*, 16(5), 681-692. <https://doi.org/10.1002/jid.1120>.
 165. Singh S., Sharma B.B., Salvi S., Chhatwal J., Jain K.C., Kumar L., Joshi M.K., Pandramajal S.B., Awasthi S., Bhave S., Rego S., Sukumaran T.U., Khatav V.A., Singh V., Sharma S.K., Sabir M. Allergic rhinitis, rhinoconjunctivitis, and eczema: prevalence and associated factors in children. *The Clinical Respiratory Journal*, 2018, 12(2): 547-556.
 166. Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E, Jenmalm MC. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy*. 2009 Dec;39(12):1842-51. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03326.x. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19735274.
 167. Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, et al. Wood RA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* (2008) 122:1154–60. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.030.
 168. Smith CD, Piasecki CC, Weera M, Olszewicz J, Lonstein JS. Correction to Smith et al. (2013). *Behav Neurosci*. 2015 Aug;129(4):411. doi: 10.1037/bne0000086. Erratum for: *Behav Neurosci*. 2013 Aug;127(4):582-97. PMID: 26214214.
 169. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al. The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014;69:76–86.
 170. Solis Soto M. T., Patiño A., Nowak D., Radon K. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema symptoms in rural and urban school-aged children from Oropeza Province - Bolivia: a cross-sectional study. *BMC Pulmonary Medicine*, 2014, 14: 40.
 171. Stanojević, S., Blagojević, V., Čuruvija, I., Veljović, K., Bajić, S. S., Kotur-Stevuljević, J., ... & Kovačević-Jovanović, V. Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* 64 during the early postnatal period improves the health of adult rats with TNBS-induced colitis, 2018. *Journal of Functional Foods*, 48, 92-105.
 172. Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, Tjota MY, Seo GY, Cao S, Theriault BR, Antonopoulos DA, Zhou L, Chang EB, Fu YX, Nagler CR. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9;111(36):13145-50. doi:

- 10.1073/pnas.1412008111. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25157157; PMCID: PMC4246970.
- 173.** Stefka AT, Feehley T, Tripathi P, Qiu J, McCoy K, Mazmanian SK, Tjota MY, Seo GY, Cao S, Theriault BR, Antonopoulos DA, Zhou L, Chang EB, Fu YX, Nagler CR. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9;111(36):13145-50. doi: 10.1073/pnas.1412008111. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25157157; PMCID: PMC4246970.
- 174.** Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, Ledford JG, Marques Dos Santos M, Anderson RL, Metwali N, Neilson JW, Maier RM, Gilbert JA, Holbreich M, Thorne PS, Martinez FD, von Mutius E, Vercelli D, Ober C, Sperling AI. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):411-421. doi: 10.1056/NEJMoa1508749. PMID: 27518660; PMCID: PMC5137793.
- 175.** Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The Influence of Probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Treatment of Obesity and Inflammatory Bowel disease. *Microorganisms*. 2020 Nov 1;8(11):1715. doi: 10.3390/microorganisms8111715. PMID: 33139627; PMCID: PMC7692443.
- 176.** Stolk, D.A., de Haas, A., Vree, J., Duinkerken, S., Lübbers, J., van de Ven, R., Ambrosini, M., Kalay, H., Bruijns, S., van der Vliet, H.J., et al. (2020). Lipo-Based Vaccines as an Approach to Target Dendritic Cells for Induction of T- and iNKT Cell Responses. *Front. Immunol*. 11.
- 177.** Strobel S. and Mowat A. (1998) Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunology Today* 19, 173±181.
- 178.** Strobel, P. (1996). From poverty to exclusion: A wage-earning society or a society of human rights? *International Social Science Journal*, 48(148), 173-189. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2451.1996.tb00071.x>
- 179.** Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, et al. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* (2016) 27:276–82. doi: 10.1111/pai.12535
- 180.** Sultan S, Taimuri U, Basnan SA, Ai-Orabi WK, Awadallah A, Almowald F, Hazazi A. Low Vitamin D and Its Association with Cognitive Impairment and Dementia. *J Aging Res*. 2020 Apr 30;2020:6097820. doi: 10.1155/2020/6097820. PMID: 32399297; PMCID: PMC7210535.
- 181.** Tan CL, Cooke EK, Leib DE, Lin YC, Daly GE, Zimmerman CA, Knight ZA. Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. *Cell*. 2016 Sep 22;167(1):47-59.e15. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.028. Epub 2016 Sep 8. PMID: 27616062; PMCID: PMC5062957.
- 182.** Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J*. 2017, 474, 1823–1836. [CrossRef] [PubMed].
- 183.** Torii, A. ; Torii, S. ; Fujiwara, S. ; Tanaka, H. ; Inagaki, N. ; & Nagai, H.. Lactobacillus acidophilus strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines, 2007. *Allergology International*, 56(3), 293-301.
- 184.** Tulyeu, J.; Kumagai, H.; Jimbo, E.; Watanabe, S.; Yokoyama, K.; Cui, L.; Osaka, H.; Mieno, M.; Yamagata, T. Probiotics Prevents Sensitization to Oral Antigen and Subsequent Increases in Intestinal Tight Junction Permeability in Juvenile-Young Adult Rats. *Microorganisms* 2019, 7, 463. [CrossRef]
- 185.** Turco MY, Sheridan MA, Zhao X, Fernando RC, Gardner L, Perez-Garcia V, Li Q, Marsh

- SGE, Hamilton R, Moffett A. Characterization of primary models of human trophoblast. *Development*. 2021 Nov 1;148(21):dev199749. **193**. doi: 10.1242/dev.199749. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34651188; PMCID: PMC8602945.
- 186.** Turnbull JL, Adams HN, Gorard DA. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;41:3–25.
- 187.** von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E. & Locksley, R. M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2- epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225 (2016)
- 188.** Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products, 2010. *Food Control*, 21(2), 136-142.
- 189.** Wang, H., Zhang, Q., Niu, Y., Zhang, X., & Lu, R. (2019). Surface-layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM attenuates tumor necrosis factor- α -induced intestinal barrier dysfunction and inflammation. *International journal of biological macromolecules*, 136, 27-34.
- 190.** Wang, T.; Zheng, N.; Luo, Q.; Jiang, L.; He, B.; Yuan, X.; Shen, L. Probiotics *Lactobacillus reuteri* Abrogates Immune Checkpoint Blockade-Associated Colitis by Inhibiting Group 3 Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1235. [CrossRef]
- 191.** Warners MJ, Terreehorst I, van den Wijngaard RM, et al. Abnormal responses to local esophageal food allergen injections in adult patients with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* 2018;154:57–60.e2.
- 192.** Wesemann DR, Nagler CR. The Microbiome, Timing, and Barrier Function in the Context of Allergic Disease. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):728-38. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.002. PMID: 27096316; PMCID: PMC4869964.
- Won, T. J., Kim, B., Lee, Y., Bang, J. S., Oh, E. S., Yoo, J. S., ... Hwang, K. W. (2012). Therapeutic potential of *Lactobacillus plantarum* CJLP133 for house-dust mite-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Cellular Immunology*, 277(1–2), 49–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.013>.
- 194.** Woodfolk JA, Commins SP, Schuyler AJ, Erwin EA, Platts-Mills TA. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses? *Allergol Int*. 2015 Oct;64(4):295-303. doi: 10.1016/j.alit.2015.06.001. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26433525; PMCID: PMC5406225.
- 195.** Xavier-Santos, S., Carvalho, C.C., Bonfá, M. *et al.* Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiol* **49**, 46–52 (2004). <https://doi.org/10.1007/BF02931645>
- 196.** Xu, M.; Wang, J.; Wang, N.; Sun, F.; Wang, L.; Liu, X.-H. The Efficacy and Safety of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for Infantile Colic: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE* 2015, 10, e0141445. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
- 197.** Yakhlef, M.; Souiki, L. Contribution to the estimation of the prevalence of food allergy in schoolchildren in the city of Guelma (Algeria). *Rev. Fr. D'allergol.* 2021, 61, 573–578. [CrossRef]
- 198.** Yan, F.; Liu, L.; Cao, H.; Moore, D. J.; Washington, M. K.; Wang, B.; ... & Polk, D. B. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood, 2017. *Mucosal Immunology*, 10(1), 117-127.

199. Yang H., Xun P. & al. Fish and Fish Oil Intake in Relation to Risk of Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE, 2013, 8(11), e80048. doi: 10.1371/journal.pone.0080048.
200. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2016 Dec;16(12):751-765. doi: 10.1038/nri.2016.111. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27795547; PMCID: PMC5123910.
201. Zamanillo Campos, R. Z., Colomar Ferrer, M. T., Ruiz López, R. M., Sanchís Cortés, M. P., & Urgelés Planella, J. R. (2021). Specific Quality of Life Assessment by the NutriQoL® Questionnaire Among Patients Receiving Home Enteral Nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 45(3), 490-498. <https://doi.org/10.1002/jpen.1852>
202. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965. doi: 10.1155/2016/4350965. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26998193; PMCID: PMC4779832.
203. Zhou C. Environmental and psychological factors and childhood asthma (phdthesis). Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. 2014, Consulté 28 avril 2020, Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01077906/document>.
204. Ziar, H., Yahla, I., Riazi, A., Gérard, P. Ca-Alginate-Carob Galactomannans Beads to Preserve Viability During Digestive Hostility Transit and Cholesterol Uptake Ability of Probiotic Bacteria, 2020. In: Benmounah, A., Abadlia, M.T., Saidi, M., Zerizer, A. (eds) Proceedings of the 4th International Symposium on Materials and Sustainable Development. ISMSD 2019. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43268-3_22
205. Ziar, H.; Gérard, P.; and Riazi, A. Calcium alginate-starch mixed gel improved the survival of Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb12 and Lactobacillus rhamnosus LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions, 2012. International Journal of Food Science and Technology, 47, 1421–1429. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2012.02989.x>.
206. Ziar, H.; Yahla, I.; Riazi, A.; Gérard, P. Ca-Alginate-Carob Galactomannans Beads to Preserve Viability During Digestive Hostility Transit and Cholesterol Uptake Ability of Probiotic Bacteria. In: Benmounah, A., Abadlia, M.T., Saidi, M., Zerizer, A. (eds) Proceedings of the 4th International Symposium on Materials and Sustainable Development. ISMSD 2019. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43268-3_22.

ANNEXE

Milieux de culture

- **Gélose nutritive (GN) (g/l)**

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	3 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium... ..	5 g
Agar.....	18 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3 ± 0,2

- **Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)**

Extrait de viande.....	3 g
Hydrolysate acide de caséine... ..	17,5 g
Amidon.....	1.5 g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,3

- **MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe) (g/l)**

Peptone	10,0 g
extrait de viande8,0 g
extrait de levure	4,0 g
Glucose.....	20,0 g
Acétate de sodium trihydraté.....	5,0 g
Citrate d'ammonium	2,0 g
Tween 80... ..	1,0 ml
hydrogénophosphate de potassium.....	2,0 g
sulfate de magnésium heptahydraté	0,2 g
sulfate de manganèse tétrahydraté.....	0,05 g
Agar.....	10,0 g

pH = 6,2



Article

Probiotic Bacteria from Human Milk Can Alleviate Oral Bovine Casein Sensitization in Juvenile Wistar Rats

Kawtar Keddar^{1,2}, Hasnia Ziar^{1,3}, Noussaiba Belmadani^{1,2}, Magali Monnoye³, Philippe Gérard^{3,*} 
and Ali Riazi¹

¹ Laboratoire des Micro-Organismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS), Abdelhamid Ibn Badis University, Hocine Hamadou Street, Mostaganem 27000, Algeria

² Laboratoire de Bio-Economie, Sécurité Alimentaire et Santé, Abdelhamid Ibn Badis University, Hocine Hamadou Street, Mostaganem 27000, Algeria

³ Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Paris-Saclay University, 78350 Jouy-en-Josas, France

* Correspondence: philippe.gerard@inrae.fr; Tel.: +33-1-34652428

Abstract: This study aims to see if probiotic bacteria from human milk could ameliorate oral cow's milk sensitization. The probiotic potential of the SL42 strain isolated from the milk of a healthy young mother was first determined. Rats were then randomly gavaged with cow's milk casein without an adjuvant or assigned to the control group. Each group was further subdivided into three groups, with each receiving only *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938, SL42, or a phosphate-buffered saline solution. Body weight, temperature, eosinophils, serum milk casein-specific IgE (CAS-IgE), histamine, and serum S100A8/A9 and inflammatory cytokine concentrations were measured. The animals were sacrificed after 59 days; histological sections were prepared, and the spleen or thymus weights, as well as the diversity of the gut microbiota, were measured. On days 1 and 59, SL42 abridged systemic allergic responses to casein by dropping histamine levels (25.7%), CAS-specific IgE levels (53.6%), eosinophil numbers (17%), S100A8/9 (18.7%), and cytokine concentrations (25.4–48.5%). Analyses of histological sections of the jejunum confirmed the protective effect of probiotic bacteria in the CAS-challenged groups. Lactic acid bacteria and Clostridia species were also increased in all probiotic-treated groups. These findings suggest that probiotics derived from human milk could be used to alleviate cow's milk casein allergy.

Keywords: probiotic; human milk; casein-induced allergy; Wistar rat; immunoglobulin E; inflammation



Citation: Keddar, K.; Ziar, H.; Belmadani, N.; Monnoye, M.; Gérard, P.; Riazi, A. Probiotic Bacteria from Human Milk Can Alleviate Oral Bovine Casein Sensitization in Juvenile Wistar Rats. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1030. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041030>

Academic Editors: Mutamed Ayyash and Shao-Quan Liu

Received: 1 March 2023

Revised: 11 April 2023

Accepted: 12 April 2023

Published: 14 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Food allergies are becoming more common around the world, particularly in developed countries, and are no longer a rare occurrence in Africa, where food allergies account for 5 to nearly 50% of allergic reactions [1]. In Algeria, food allergies affect 8.5% of schoolchildren, according to Yakhlef and Souiki [2]. Cow's milk protein allergy (CMPA) is a type of food allergy that is most common in infants and children under the age of three. The most common symptoms are dermatitis, urticaria or oral allergy syndrome, and gastrointestinal (GI) disorders such as changes in stool frequency and consistency, mucous or blood spots in stools, infantile colic, nausea, vomiting, and gastroesophageal reflux [3]. CMPA affects approximately 8% of infants and young children. After egg, peanut, and fish allergies, it is the fourth-most common food allergy in babies [4].

A variety of factors may play a role in the complex development of food allergies. A disruption in the development of oral tolerance has been observed in infants with food allergies, characterized by defects in the induction of regulatory T cells, and the production of allergen-specific neutralizing IgA antibodies [4]. Furthermore, even though the specific properties of the allergens themselves contribute to the degree of allergenicity, defects in the epithelial barrier, both in the skin and in the intestine, as well as changes in the pH of

the stomach are thought to promote allergy. Furthermore, we are only now beginning to understand how the microbiome can help with allergy problems [5,6].

Breastfeeding is undeniably beneficial, according to scientific evidence. Breast milk is the only milk that can be permanently adapted to the needs of a growing infant. One of the advantages of breastfeeding is that it helps to prevent allergies [7]. However, while a large number of studies support breastfeeding's role in lowering the risk of allergy, other studies examining the effect of prolonged breastfeeding do not. Animal models and in vitro evidence indicate that the gut microbiome may protect against food allergy, and that probiotics may be a useful tool [8]. However, there is no consistent evidence for identifying the specific bacterial species, dosage, and optimal duration for achieving the desired immunomodulation [9]. Early-life probiotic supplementation via breast milk may be a useful approach to the primary prevention of a variety of human allergic diseases.

Breast milk from healthy women contains approximately 10^3 to 10^4 CFU/mL commensal microbes and serves as a source of probiotics for infants [10]. Human milk microbiota diversity is influenced by maternal and environmental factors such as breastfeeding practice, behavior, other milk components, genetics, geographical region, race, and population [11]. The evidence as to whether probiotics can induce tolerance in food allergy is currently not clear. To the best of our knowledge, published studies conducted on the anti-food allergy potential of probiotic bacteria gave variable results [12–14], and no one used probiotic strains from human milk. *Lactobacillus* strains, including the *L. casei* strain Shirota, the *L. plantarum* strain L-137, and the *L. acidophilus* strain L-92, have been reported as probiotics that modify antigen-specific serum immunoglobulin (IgE) levels in animal models [12,15,16]. We hypothesized that the prevention of allergy using probiotics may be more effective at juvenile age and that bacterial strains from human milk would be the most appropriate probiotics for that purpose. Therefore, in the present study, we assess the preventive effects of dietary intervention with probiotics from human milk to clarify their tolerogenic effect in managing food allergy symptoms at juvenile age. *Limosilactobacillus reuteri* Protectis (DSM 17938) or isolated SL42, whose genetic and probiotic properties were characterized, were given to juvenile female Wistar rats, sensitized intragastrically (i.g.) with casein from cow's milk, as an animal model.

2. Materials and Methods

2.1. Bacteria Used in This Study

Limosilactobacillus reuteri Protectis DSM 17938 (formally known as *Lactobacillus reuteri*) was the reference strain from breast milk supplied by the PEDIACt laboratory BioGaia (Asnières-sur-Seine, France). SL42 is an isolated strain from the breast milk of a healthy young mother (Algeria). Each strain was grown in de Man, Rogosa, and Sharpe broth (Biomérieux, Craaponne, France) supplemented with cysteine-HCl (MRS-cys) under anaerobic conditions at 37 °C for 24 h.

2.2. Using 16S rRNA Gene Sequencing to Identify SL42 Isolate

Identification of SL42 was made primarily by partial sequencing of 16S rRNA genes. The extraction of bacterial genomic DNA was performed using the GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaysia) according to the manufacturer's instructions. The complete 16S rRNA gene region was amplified via primers, 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') and 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Selangor DE, Malaysia). The PCR products were further verified using 1% agarose gel electrophoresis and subjected to sequencing (Seri Kembangan, Selangor, Malaysia; <https://apicalscientific.com/>, accessed on 22 December 2022). The identification of the isolate was carried out by comparison with reference sequences using the NCBI BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, accessed on 22 January 2023). The neighbor-joining method was used to construct a phylogenetic tree (MEGA 6.0 program).

2.3. Characterization of the Probiotic Potential

To attribute the qualification of “probiotic” to the SL42 strain, the following tests were performed for both bacteria strains used in the in vivo part of this study, where the SL42 isolate was compared with the probiotic strain of DSM 17938 taken as reference. Bacterial loads were adjusted at 1 to 5×10^7 CFU/mL in all experiments. All microbiological components were purchased from Merck and chemicals from Sigma (France), unless otherwise specified.

2.3.1. pH and Bile Tolerance Assays

The method previously described by Ziar and Riazi [17] was slightly modified. Bacteria were cultivated (individually) into pH 2 MRS broths and incubated at 37°C for 2 h. MRS-cys agar plates were used to determine viable counts every 30 min exposure. Bacteria bile salt tolerance was determined via the viable count method as previously described [18]. Following incubation for 24 h at 37°C , the culture was centrifuged $5000 \times g$ at 40°C for 10 min. Eventually, 0.02 mL of bacterial suspension was inoculated in freshly sterile phosphate buffer of pH 7.5 containing bile (0.3% *v/v*; Sigma-Aldrich, France). Following incubation at 37°C for 24 h, viable counts were observed on MRS-cys agar plates.

2.3.2. Detection of Antimicrobial Activity

Both probiotic strains were tested for antimicrobial activity. Seven pathogenic indicator bacteria and one fungus, *Candida albicans*, were used. Probiotic bacteria were cultured in an MRS-cys medium for 24 h at 37°C , then centrifuged at $8000 \times g$ for 15 min at 4°C (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and cell-free supernatant yielded before the assay. The pH was adjusted to 6.5 with 6 mol/L NaOH, and then filtered via a membrane with a pore size of 0.22 μm . The modified Oxford cup double plate method was used to determine the antimicrobial activity [19]. Oxford cup (5 mm) was placed on an agar surface and the pathogen indicator exponential phase (100 μL , 1×10^7 CFU/mL) was spread on the nutrient agar surface; then, 200 μL supernatant was added in wells. Following incubation at 30°C for 24 h, the diameters of the clear inhibitory zone were measured.

2.3.3. Hydrophobicity

Hydrophobicity of bacteria was determined using xylene extraction according to the method of Perez et al. [20], and hydrophobicity percentage (H %) was calculated using Equation (1):

$$H\% = [(A_0 - A) / A_0] 100 \quad (1)$$

where A_0 and A are absorbance values measured before and after xylene extraction.

2.3.4. Hemolytic Activity

Bacterial cultures were observed on defibrinated sheep blood to a concentration of 5% (*w/v*) on blood agar plates [21], incubated for 24 h at 48°C . Hemolytic activity was verified by β -hemolysis (bright zones around colonies), α -hemolysis (green zones around colonies), and γ -hemolysis (no zone around colonies) reactions.

2.3.5. Cholesterol Uptake

The method of Ziar et al. [22] was followed. In brief, MRS-THIO medium containing 2% (*w/v*) sodium thioglycolate was supplemented with 85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of water-soluble cholesterol, previously sterilized by filtration on a membrane Millipore (C1145, cholesterol-PEG 600; Sigma). Bile at a final concentration of 0.3% and the bacterial inoculum (1%, *w/v*) were then added. The milieu was incubated at $37^\circ\text{C}/24$ h in anaerobic conditions (anaerobic jar with CO_2 generating system, Anaerocult, Merckmillipore, Fontenay-sous-Bois, France). To estimate the amount of assimilated cholesterol, the cultures were centrifuged ($2000 \times g/10$ min at 4°C) after 24 h of incubation, and the pellets were washed with sterile distilled water, and dried at 80°C until the weight remained stable. Bacteria were tested for

their cholesterol uptake capacities, expressed by the specific ability to reduce the available cholesterol from the culture medium after 24 h incubation, which was calculated according to the formula proposed by Pereira and Gibson [23].

2.3.6. Antibiotic Susceptibility

An antibiotic susceptibility test was performed with 11 different antibiotics, including those used as cell wall or protein synthesis inhibitors, and the broad-spectrum antibiotics known to be effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria [24]: amoxicillin, penicillin, gentamicin, streptomycin, chloramphenicol, norfloxacin, ciprofloxacin, sulfonamide, clindamycin, novobiocin, and vancomycin. Fresh overnight cultures of probiotic bacteria were inoculated separately at 0.5 McFarland in Mueller–Hinton agar. Subsequently, antibiotic discs were added onto inoculated Mueller–Hinton agar plates. The diameters of the inhibition zones around the antibiotic discs were observed following a 24–48 h incubation period at 37 °C. The sensitivity conditions were determined according to NCLS standards [25].

2.4. In Vivo Study

2.4.1. Animal Housing

Female Wistar rats were shipped from Pasteur Institute (Algiers, Algeria) at 6 weeks of age (80–100 g). Housing rooms were kept at constant temperature (24 ± 2 °C) with an adequate light: dark cycle (12:12). All procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Mostaganem. Parental rats were housed in pairs in polycarbonate cages with *ad libitum* access to distilled and sterilized water and were fed a diet without allergens (SARL Aliment souris et rat: La Ration, Bouzaréah, Algiers, Algeria) for three successive generations. The third filial generation was used in this experiment at juvenile age and rats were acclimatized under the same conditions (2 rats/cage) cited above for 15 days before the beginning of the casein challenge.

2.4.2. Experimental Design

The following in vivo experiment is illustrated in Figure 1. The female rats of 3 weeks old were randomly divided into 6 groups (n = 8 rats per group): control group receiving only phosphate-buffered saline solution (PBS) (C), nonsensitized group treated with SL42strain, nonsensitized group treated with DSM 17938 strain, casein-sensitized (Protifar©, 90% cow's milk casein, EAN 8712400748124, NUTRICIA Nutrition Clinique, Rueil-Malmaison Cedex, France) group (CAS), casein-sensitized group treated with SL42 (CAS + SL42), and casein-sensitized group treated with DSM 19738 strain (CAS + DSM 19738).

Before (−3 day) and during casein challenge, each rat from the probiotic-treated groups received 10^8 CFU of DSM 19738 or SL42 in 1 mL physiological water by gavage every other day. Casein challenge was started by giving i.g. 60 mg casein without adjuvant during the first 42 days, then was associated to 20 mg gluten during the rest of the period of challenge (days 43–57). After that, sensitization using cow's milk casein was interrupted for one day prior to sacrifice.

2.4.3. Assessment of Macroscopic Casein Allergy Symptoms

Macroscopic casein allergy symptoms were assessed by monitoring rats every 30 min, and during the 3 h following cow's milk casein sensitization. Clinical signs of anaphylaxis were scored depending on the gravity of the developed symptom: 0 for no signs; 1 for scratching and rubbing nose and head; 2 for bags around eyes and mouth; 3 for diarrhea; 4 for reduced activity with a satisfied respiratory rate, cyanosis around mouth and tail, and no activity; and 5 for death.

Diarrhea score was classified using Bristol scale: 1 for separate hard lump, 2 for lumpy feces, 3 for sausage-shaped feces with cracks on the surface, 4 for smooth and soft form, 5 for soft blobs with clear-cut edges, 6 for mushy blobs with ragged edges, and 7 for entirely liquid feces.

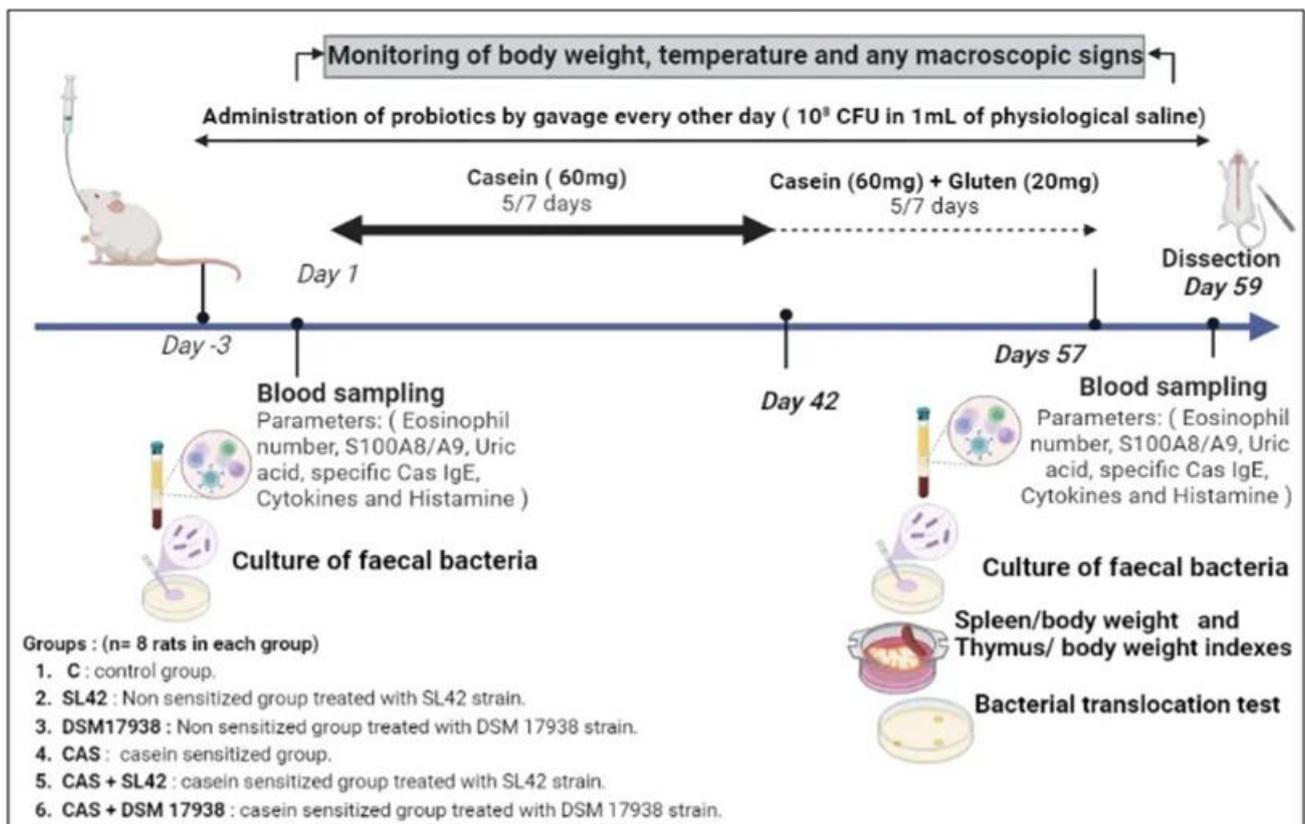


Figure 1. Experimental design of the present study. Bovine casein (Protifar©) was taken as allergen and was administered intragastrically to rats without the use of adjuvant. A total of 48 female rats (3 weeks old) were randomly divided into 6 groups (n = 8 rats per group): control group receiving only PBS (C group), nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42 group), nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 1938 group), casein-sensitized group (CAS group), casein-sensitized group treated with SL42 (CAS + SL42 group), and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (CAS + DSM 17938 group). In all probiotic-treated groups, SL42 or DSM 17938 were given every other day from day –3 to day 58.

The weight of the rats was recorded during the experiment to assess the effect of CAS-induced sensitization on body weight. Rectal temperature was measured after cow's milk casein sensitization and every 30 min (RET-2probe, Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Stress status of rats was estimated by measuring serum uric acid concentration determined by fluorometry (MAK077-1KT, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

2.4.4. Determination of Specific Casein IgE, Histamine, S100A8/A9, Inflammation-Associated Cytokines, and Eosinophil Number

The levels of S100A8/A9, TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the blood were determined using ELISA Assay Kit according to the manufacturer's instructions (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Serum was collected 30 min after casein administration and tested for histamine using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Serum levels of casein-specific IgE (CAS-IgE) were also assessed using ELISA kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The number of eosinophils in the blood was determined using Hemogram technique (Mindray 2800 BC brand automatic blood count device, Bath, UK).

2.4.5. Cultivation of Bacteria from Feces

Fecal samples were collected before and after the challenge and plated on Hektoen/TSA for nonspecific bacteria, and MRS/MRS-cys media for lactic acid bacteria enumeration [26]. After 48–72 h incubation, the bacterial loads were expressed as CFU/g of fecal material. Clostridia species were counted after initial enrichment followed by plating on TSA II (4 days) with 5% sheep blood (Fisherscientific, CA) [27].

2.4.6. Determination of Spleen/Body Weight Index and Thymus/Body Weight Index

The rats were weighed and sacrificed. The rats' spleens and thymuses were removed and weighed immediately. The spleen index (SI) and thymus index (TI) were calculated using Equation (2) [28]:

$$\text{SI or TI (mg/g)} = (\text{weight of spleen or thymus})/\text{body weight} \quad (2)$$

2.4.7. Histological Analysis

Intestinal tissues (jejunum) were removed on the day of dissection, fixed in 10% phosphate-buffered formalin, and embedded in paraffin. The jejunum sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for the observation of inflammatory infiltrates and eosinophils and identification of goblet cells.

2.4.8. Bacterial Translocation Test

The spleen and the mesenteric lymph nodes (MLN) of rats were macerated and suspended in sterile physiological saline. Serial dilutions were plated and incubated overnight at 37 °C on MacConkey agar (24 h), blood agar, and MRS-cys agar (48 h) (Merck, France).

2.5. Statistical Analysis

The mean \pm standard error of the mean or standard deviation was used to present experiment's data for statistical analysis implementation (SPSS statistics 26, Chicago, IL, USA). Statistical significance was determined using Student's *t*-test, and one-way ANOVA was used for parametric tests. Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

2.6. Ethics Approval

The animal research presented in this manuscript was carried out ethically in accordance with the Helsinki Declaration and the ARRIVE guidelines for in vivo experiments. Furthermore, the Ethics Committee of the Faculty of Life Science and Nature affiliated with Abdelhamid Ibn Badis University of Mostaganem approved this research (Approval No. 2019-013).

3. Results

3.1. SL42 Is a *Lactocaseibacillus rhamnosus* as Confirmed by 16S rRNA Analysis

After catalase (negative), Gram tests (positive), and morphological (white and smooth colonies with approximately 2 mm diameter were picked from MRS-cys agar) and biochemical analyses, SL42 was subcultured at 37 °C to obtain pure cultures for molecular identification. The 16S rRNA gene sequence of strain SL42 was sequenced and compared against known strains based on BLAST searches. SL42 was subsequently identified as *Lactocaseibacillus rhamnosus* as confirmed by the results of a phylogenetic analysis (Figure 2). *L. rhamnosus* SL42 was deposited in NCBI GenBank under the accession number OQ300076, showing a sequence similarity of 98–99% when compared with the known *Lactocaseibacillus rhamnosus* species (Table S1).

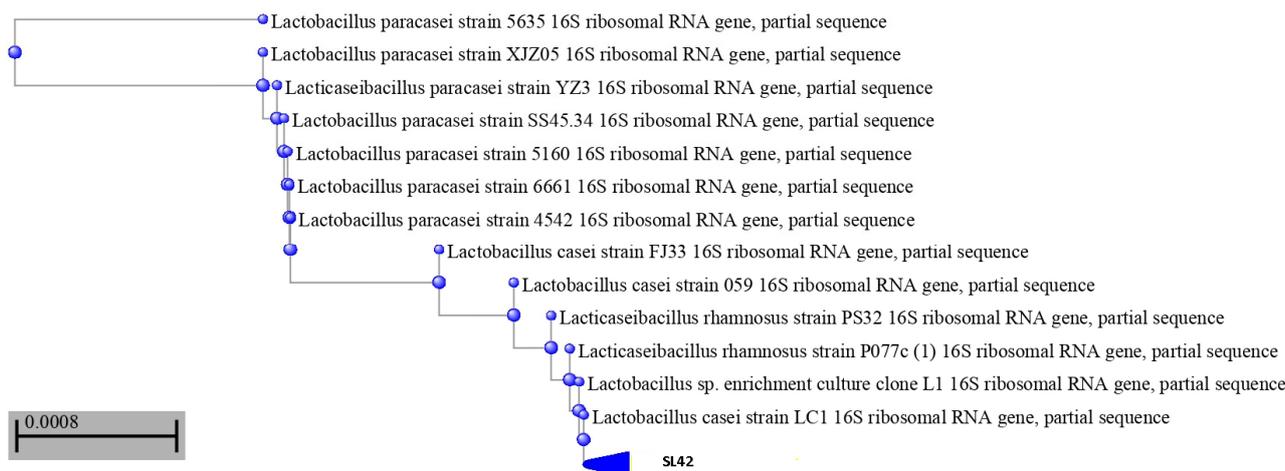


Figure 2. Constructed phylogenetic tree showing the position of the isolated SL42 with related *Lactobacillus* species.

3.2. *L. rhamnosus* SL42 Expresses a Satisfying Probiotic Potential

The *L. rhamnosus* SL42 showed high acid tolerance and survivability at pH 2 (93%) after 2 h. The *L. rhamnosus* SL42 was also tolerant to pancreatic and pepsin enzymes under simulated digestive conditions (data not shown). Moreover, approximately 90.5% of *L. rhamnosus* SL42 cells survived with 0.3% bile and assimilated 6.01 mg/g cholesterol. The isolated *L. rhamnosus* SL42 strain also showed a high hydrophobicity of 51% (Table 1).

Table 1. Probiotic characteristics * of SL42 strain reported in this study.

Parameters	<i>L. rhamnosus</i> SL42	<i>L. reuteri</i> DSM 17938
	Cell Viability/Activity	
Acid resistance (pH = 2)	2×10^7 CFU/mL (0 min)	5×10^7 CFU/mL (0 min)
	7.5×10^6 CFU/mL (30 min)	2.3×10^7 CFU/mL (30 min)
	6.9×10^6 CFU/mL (60 min)	1.9×10^6 CFU/mL (60 min)
	6.6×10^6 CFU/mL (120 min)	1.2×10^6 CFU/mL (120 min)
Bile survival (0.3%)	5×10^7 CFU/mL (0 min)	2.3×10^7 CFU/mL (0 min)
	1.4×10^7 CFU/mL (4 h)	2.1×10^6 CFU/mL (4 h)
	9.3×10^6 CFU/mL (24 h)	1.2×10^6 CFU/mL (24 h)
Cholesterol uptake	6.01 mg/g	6.09 mg/g
Hydrophobicity (%)	51%	76%
Hemolytic activity	γ -hemolytic (no hemolysis)	γ -hemolytic (no hemolysis)

* The results are means of 3 independent replicates (n = 3).

L. rhamnosus SL42 cells strongly inhibited *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with the highest inhibitory zones being 18 and 17 mm, respectively. The inhibitions of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella pneumoniae* were weaker, with inhibition zones between 11 and 15 mm (Table 2).

L. rhamnosus SL42 exhibited variable antibiotic susceptibility (5/11) to penicillin, amoxicillin, chloramphenicol, novobiocin, and norfloxacin (Table 3). However, the strain was found to be gentamicin-, sulfonamide-, and vancomycin-resistant (as was *L. reuteri* DSM 17938).

Table 2. Antimicrobial activity * of probiotic bacteria.

Pathogens	Inhibition Zone (mm)	
	<i>L. rhamnosus</i> SL42	<i>L. reuteri</i> DSM 17938
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14 ± 0.18	13 ± 0.36
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	18 ± 0.02	14 ± 0.10
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	9 ± 0.11	6 ± 0.10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	15 ± 0.30	8 ± 0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	17 ± 0.22	15 ± 0.20
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis ATCC 4931	9 ± 0.08	16 ± 0.04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	11 ± 0.02	14 ± 0.20
<i>Shigella</i> sp. (isolate from our collection)	5 ± 0.02	6 ± 0.10

* The results are means of 3 independent replicates (n = 3) ±SD.

Table 3. Antibiotic susceptibility * of probiotic bacteria.

Probiotic Bacteria	Antibiotic Susceptibility (mm)										
	Amoxicillin (30 µg)	Ciprofloxacin (5 µg)	Gentamicin (10 µg)	Penicillin (10 µg)	Sulfonamide (25 µg)	Streptomycin (10 µg)	Clindamycin (2 µg)	Chloramphenicol (30 µg)	Vancomycin (30 µg)	Norfloxacin (10 µg)	Novobiocin (4 µg)
<i>L. rhamnosus</i> SL42	15 ± 0.1 I	0 ± 0.01 R	10 ± 0.02 R	20 ± 0.01 S	0 ± 0.1 R	0 ± 0.1 R	0 ± 0.0 R	25 ± 0.1 S	8 ± 0.03 R	16 ± 0.1 I	22 ± 0.02 S
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	0 ± 0.01 R	16 ± 0.02 I	8 ± 0.01 R	15 ± 0.01 I	0 ± 0.1 R	16 ± 0.1 I	18 ± 0.0 I	16 ± 0.1 I	12 ± 0.02 R	16 ± 0.1 I	22 ± 0.0 S

* The results are means of 3 independent replicates (n = 3) ±SD. Abbreviations are S, sensitive; I, intermediate; R, resistant. The zone of inhibition (mm) for each antibiotic was measured and interpreted as follows: ≥19 mm = sensitive (S); 15–18 mm = intermediate (I); ≤14 mm = resistant (R).

3.3. Macroscopic Symptoms Disappear after One-Week Casein Gavage

Diarrhea was only observed during the first week of CAS gavage. The diarrheic score was 7 and 4 on the Bristol scale for rats receiving exclusively CAS (50% of rats) or CAS-probiotic bacteria (33% of rats), respectively.

There were no differences in body weight and temperature between the experimental and the control groups (all $p > 0.05$) during the entire study (Figure S1; Table S2). Uric acid levels in rat sera were significantly (all $p < 0.05$) increased from the 1st day to the 58th day in all CAS-sensitized rats (49.8%: CAS + SL42; 51.9%: CAS + DSM 17938; 74.7%: CAS) and remained unchanged in the control group and those receiving only individual probiotic bacteria (Figure S2).

3.4. Calprotectin, Eosinophils, and Cytokines Associated with CAS- Induced Allergy Were Successfully Decreased in Plasma of Rats Gavigated with the SL42 Strain

Significantly ($p < 0.05$) higher levels of CAS-specific IgE and histamine were detected in the sera of all rats treated with CAS. Sensitization with casein triggered the production of specific IgE with an average of 34.25 ± 1.25 (IU/L) in CAS-treated rats (Figure 3a). CAS-probiotic-treated rats exhibited an almost 50% reduction ($p < 0.05$) with registered values of 15.89 ± 0.89 IU/L on average in the SL42-treated group, and 17.98 ± 0.53 IU/L on average in the DSM 17938-treated group. Similar trends were obtained for histamine levels with 25.6 ± 1.6 nmol/L ($p < 0.05$) in the CAS-treated group

compared with 19 ± 1 and 20.5 ± 0.8 nmol/L for the SL4- and DSM 17938-treated groups, respectively (Figure 3b). The control groups and those receiving only individual probiotic bacteria produced neither CAS-specific IgE nor histamine.

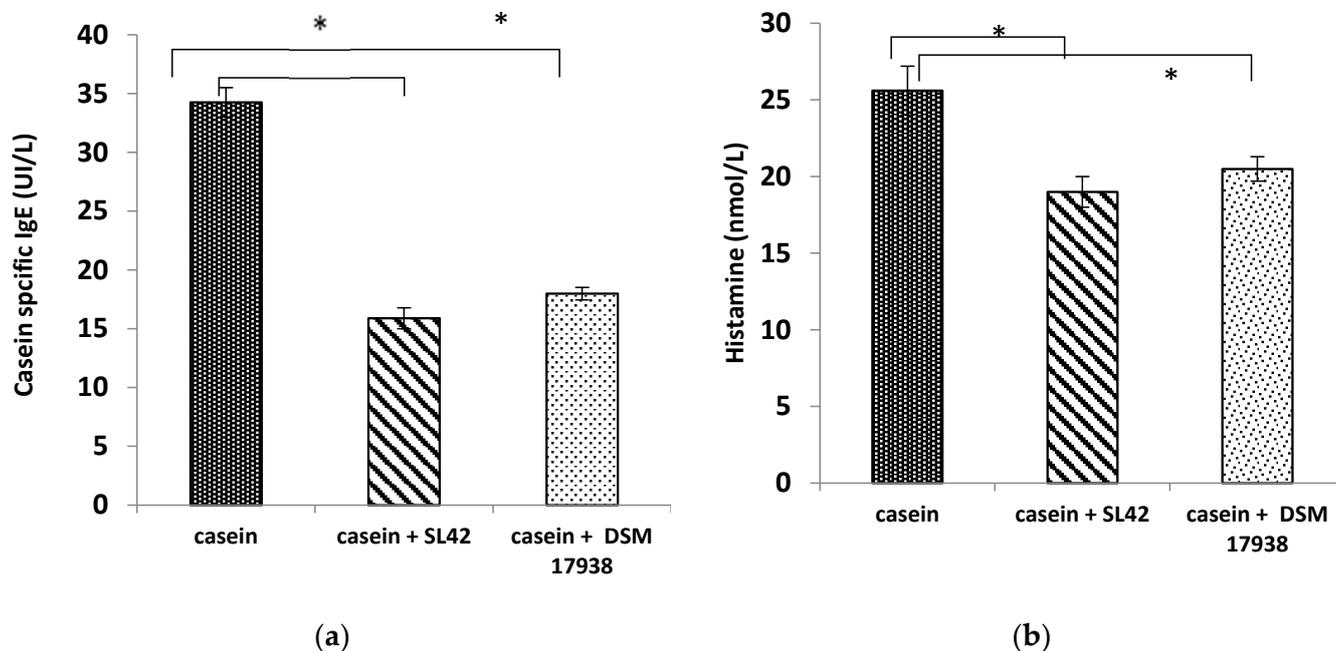


Figure 3. CAS-IgE (a) and histamine levels (b) in sera assessed using ELISA ($n = 8$ rats/ group). The data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$. Casein-sensitized group receiving only casein (casein group), casein-sensitized group treated with SL42 (casein + SL42 group), and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (casein- + DSM 17938 group).

The plasma levels of S100A8/A9 were increased in the CAS group compared with the control group and the probiotic-treated groups. The level of S100A8/A9 was statistically different on days 1 and 59 (all $p < 0.05$), as seen in Figure 4a. SL42 decreased calprotectin (S100A8/9) by 18.7% in CAS + SL42-treated rats.

The levels of TLR4 were higher in the CAS group than in the control group or the probiotic-treated groups, and significant differences were found on days 1 and 59 (all $p < 0.05$), as seen in Figure 4b. SL42 decreased TLR4 by 25.45% in CAS + SL42-treated rats.

The plasma levels of TNF- α , NF- κ B, IL-1 β , and IL-6 were higher in the CAS group than in the control group, and significant differences were found on day 1 and day 59 (all $p < 0.05$), as seen in Figure 4c–f, respectively. SL42 decreased TNF- α , NF- κ B, IL-1 β , and IL-6 by -14.31% to -48.58% in CAS + SL42-treated rats.

Moreover, the number of eosinophils was also increased, with an average of $108.5 \pm 10.66/\text{mm}^3$ in CAS-sensitized rats without probiotic treatment (Figure 5). Administration of the SL42 strain decreased the number to $90 \pm 1.41/\text{mm}^3$ (-16.67%), whereas treatment with the probiotic strain DSM17938 decreased eosinophil numbers to $93 \pm 7.03/\text{mm}^3$ (-13.88%). Groups receiving only the individual probiotic bacteria exhibited $\sim 50\%$ lower values, ranging from 51.25 to $52/\text{mm}^3$ (Figure 5).

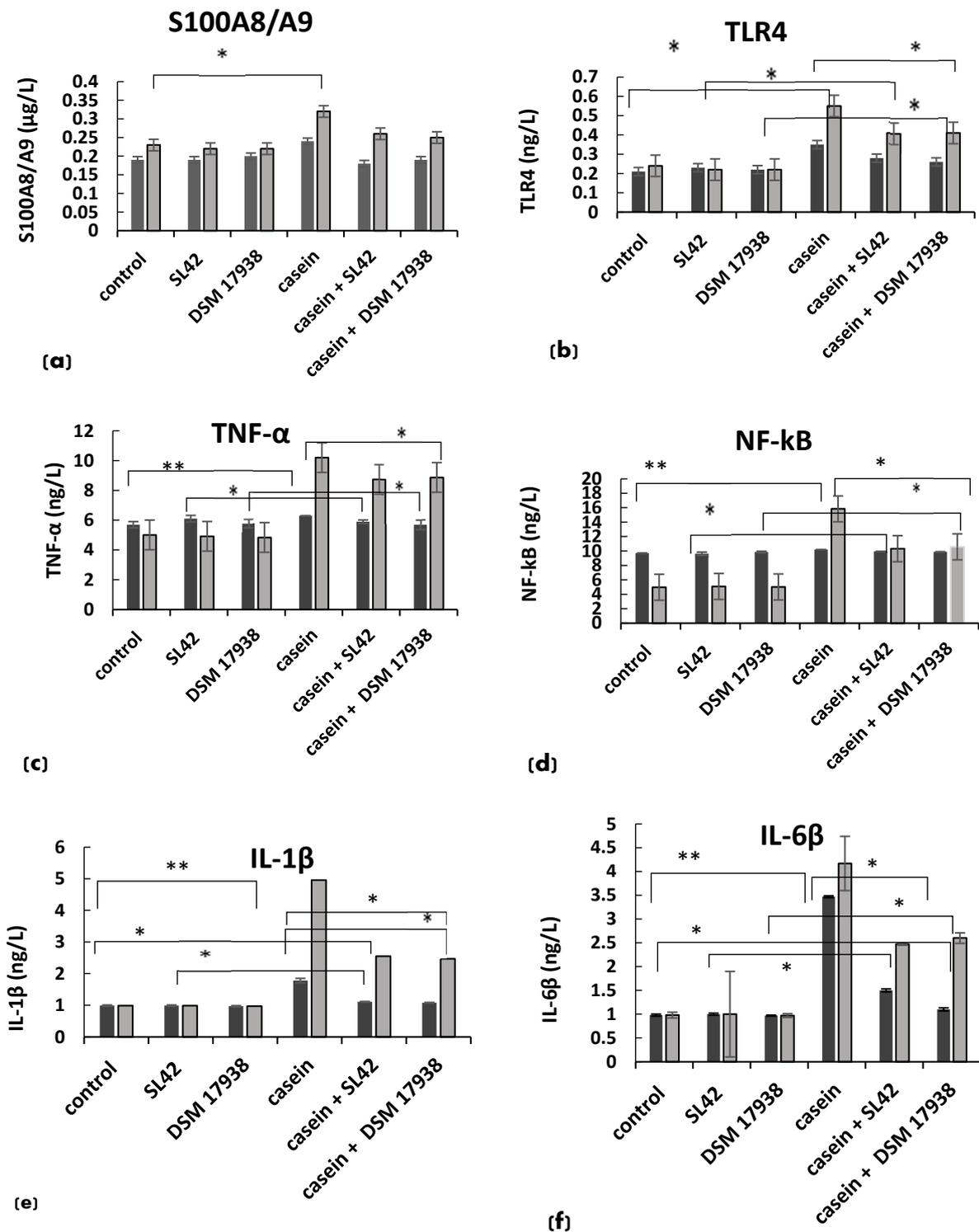


Figure 4. The expression of S100A8/A9 and associated cytokines in Wistar rats sensitized intragastrically by administration of casein without adjuvant (before 1st day, after 58th day). S100A8/A9 (a), TLR4 (b), TNF-α (c), NF-κB (d), IL-1β (e), and IL-6 (f) levels in sera of rats from different groups are shown. Values are means ± SEM (n = 8 rats/group). * *p* < 0.05. ** *p* < 0.01. Control group receiving only PBS (control group), nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42 group), nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 17938 group), casein-sensitized group (casein group), casein-sensitized group treated with SL42 (casein + SL42 group), and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (casein + DSM 17938 group).

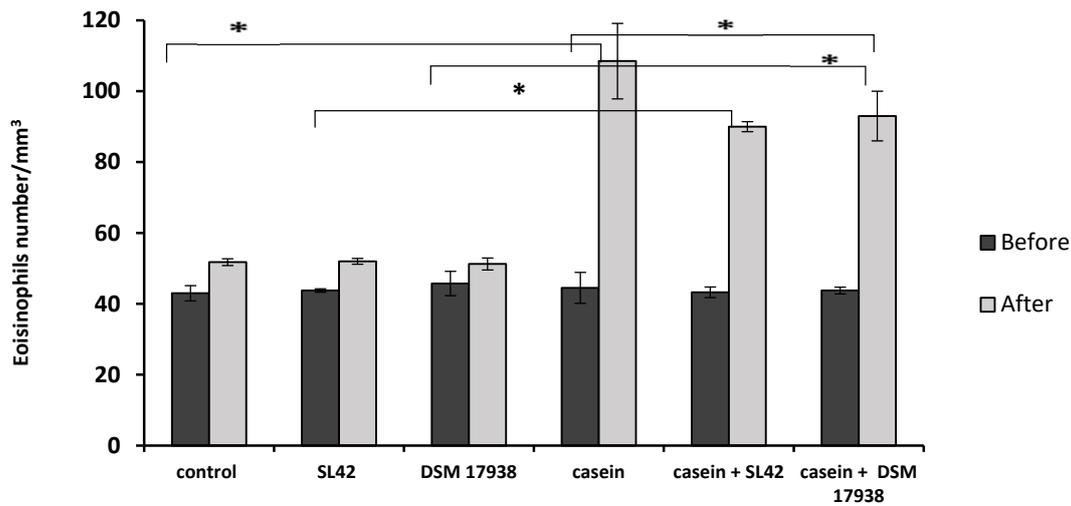


Figure 5. Eosinophil numbers in blood as determined using hemogram technique (n = 8 rats/ group). Wistar rats were sensitized intragastrically by administration of casein without adjuvant (before 1st day, after 58th day). Data are presented as the mean ± SD. Statistical analysis was conducted by using one-way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons test. * p < 0.05. Control group receiving only PBS (control group); nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42 group); nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 17938 group); casein-sensitized group (casein group); casein-sensitized group treated with SL42 (casein + SL42 group); and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (casein- + DSM 17938 group).

3.5. Probiotic Administration Modifies LAB and Clostridia Populations in Rats

Figure 6 shows the population of lactic acid bacteria (LAB) and nonspecific bacteria obtained by plating techniques. Before the CAS challenge (data not shown), the bacterial profile was comparable (p > 0.05) between nonsensitized and CAS-sensitized rats. Administration of probiotic bacteria markedly increased the density of LAB (Figure 6a) and Clostridia species, but not of nonspecific bacteria (Figure 6b). After the 58th day of the CAS challenge, the rats exhibited a diminished density of fecal LAB and an increased density of nonspecific bacteria (Figure 6a,b). The alterations in the enteric bacteria observed in CAS-treated rats were restored by the administration of SL42, where the populations of LAB (Figure 6a) and nonspecific microbes were significantly (Figure 6b) (p < 0.05) increased and decreased, respectively.

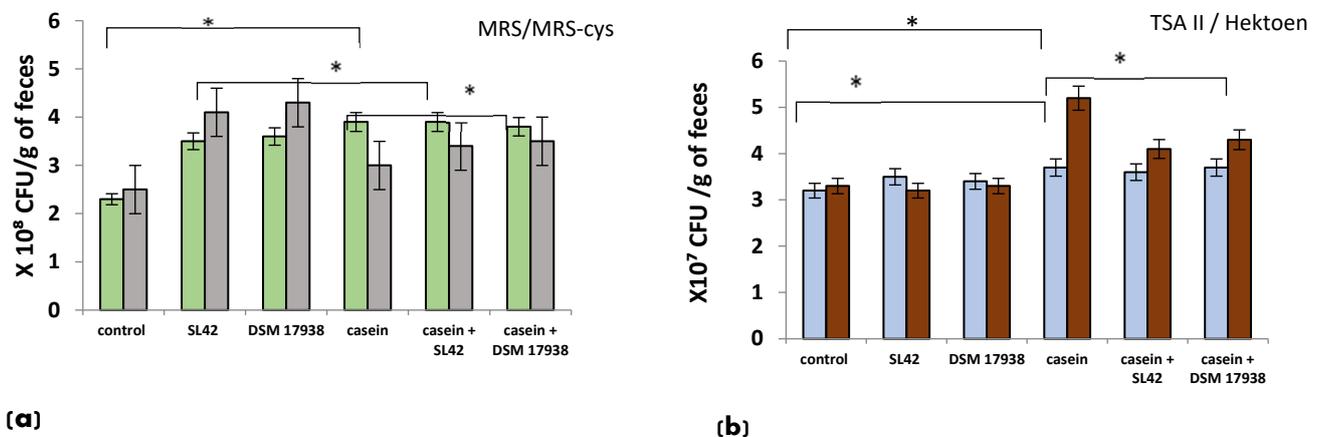


Figure 6. Bacteria numbers as determined by plating technique (n = 8 rats/ group). Lactic acid bacteria (a), Clostridia species (b). Wistar rats were sensitized intragastrically by administration of casein without adjuvant. The rats were fed every other day with *L. rhamnosus* SL42 or *L. reuteri* DSM 17938 at 1 × 10⁸ CFU/mL (feces were collected on the 59th day). The dose volume was 1 mL.

The control group was fed with sterilized PBS solution. The data (MRS ■, MRS-cys ■, TSA II ■, Hektoen ■) are presented as the mean \pm SD. Statistical analysis was conducted by using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$. Control group receiving only PBS (control group); nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42 group); nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 17938 group); casein-sensitized group (casein group); casein-sensitized group treated with SL42 (casein + SL42 group); and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (casein- + DSM 17938 group).

3.6. Probiotic Administration Does Not Change Spleen and Thymus Weights

Figure 7 shows the effects of the two probiotic strains SL42 and DSM 17938 on the thymus and spleen indices of the rats. Compared with the control group, the thymus and spleen indices were not found to be significantly different in the SL42 and DSM 17938 probiotic-treated groups (all $p > 0.05$).

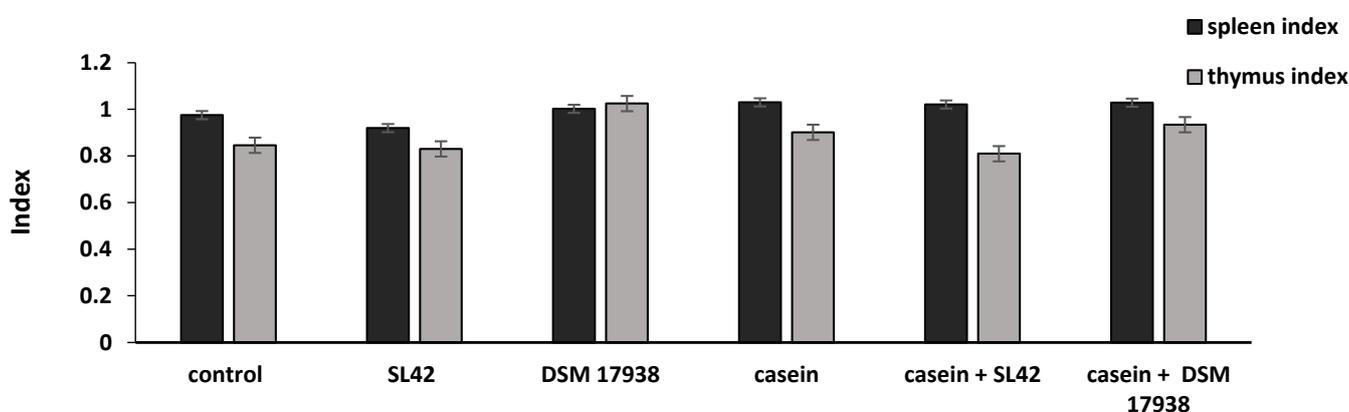


Figure 7. Effects of probiotic bacteria on the thymus and spleen indices of rats. Wistar rats were sensitized intragastrically by administration of casein without adjuvant. The rats were fed every other day with *L. rhamnosus* SL42 or *L. reuteri* DSM 17938 at 1×10^8 CFU/mL. The dose volume was 1 mL. The control group was fed with sterilized PBS solution. Thymus and spleen samples from each group were collected on the 59th day (day of sacrifice). The thymus and spleen indices were measured as the ratio of the thymus or spleen weight to rat body weight. Values are means \pm SD ($n = 8$ rats/group). No significant differences were observed at $p > 0.05$. Control group receiving only PBS (control); nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42); nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 17938); casein-sensitized group (casein); casein-sensitized group treated with SL42 (casein + SL42); and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (casein- + DSM 17938).

3.7. Inflammation of Jejunal Tissue and Eosinophil Infiltration were Significantly Reduced by Probiotic Treatment

Hematoxylin and eosin staining showed that the jejunal mucosa was inflamed in the CAS sensitization group (Figure 8). The histological inflammation score in that group was 2 (mild to moderate), and eosinophil infiltration was also significantly increased ($p < 0.05$) compared with the control (Figure 8). In contrast, the intestinal inflammation scores and degrees of eosinophil infiltration were significantly reduced by probiotic treatment in comparison with the CAS sensitization group (casein) (Figure 8). Moreover, villus length in the casein group was significantly reduced ($p < 0.05$), although the probiotic treatment groups showed almost normal features similar to those in the controls (Figure 8).

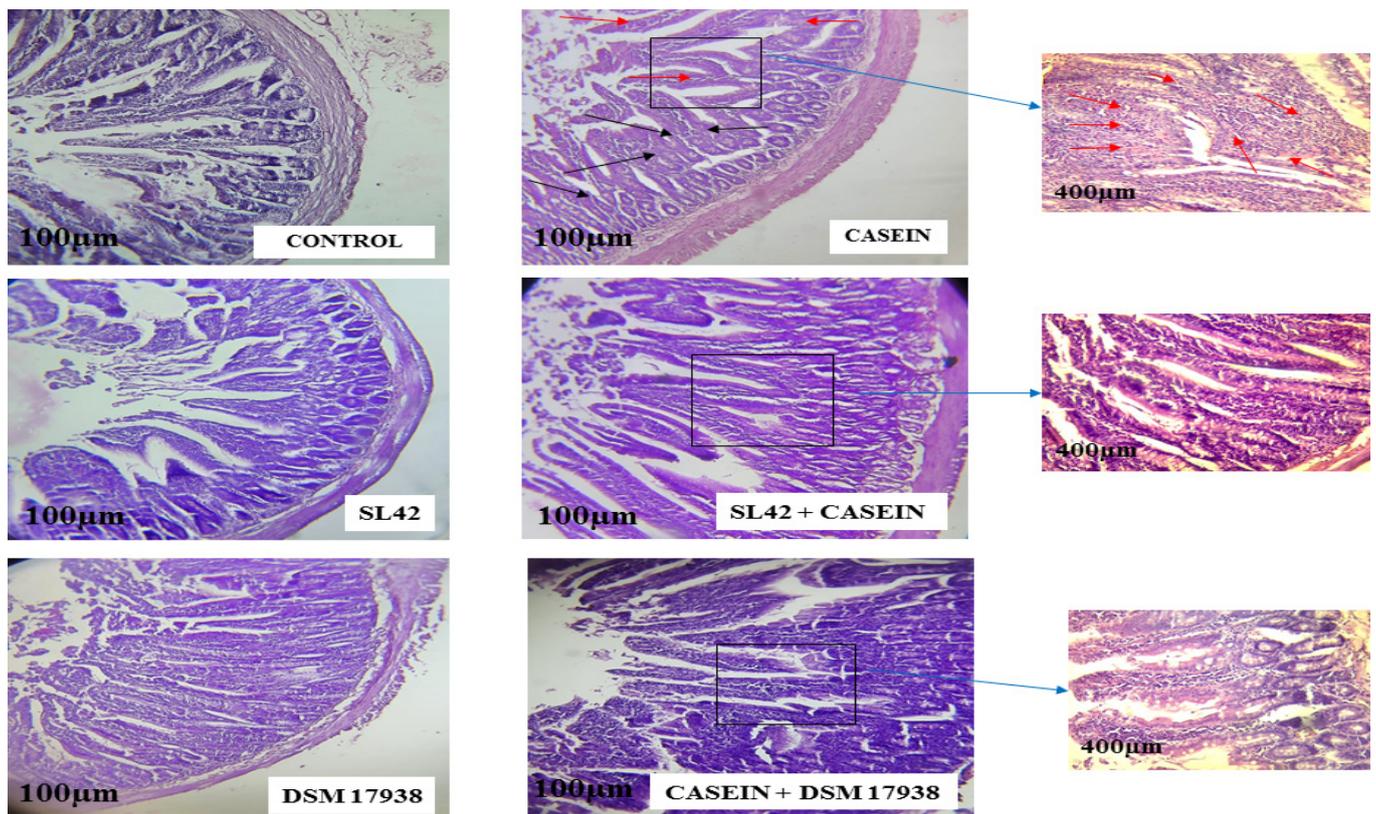


Figure 8. Representative HE-stained sections of jejunal mucosae are shown at original magnification, 100 µm. Wistar rats were sensitized intragastrically by administration of casein without adjuvant. The rats were fed every other day (−3rd to 58th day) with *L. rhamnosus* SL42 or *L. reuteri* DSM 17938 at 1×10^8 CFU/mL. The dose volume was 1 mL. The black and red arrows indicate eosinophil infiltration and goblet cells, respectively. Control group receiving only PBS (control); casein-sensitized group (casein); nonsensitized group treated with SL42 strain (SL42); casein-sensitized group treated with SL42 (Casein + SL42); nonsensitized group treated with DSM 17938 strain (DSM 17938); and casein-sensitized group treated with DSM 17938 strain (Casein- + DSM 17938).

3.8. Probiotic Bacteria SL42 and DSM17938 Prevent Bacterial Translocation to Mesenteric Lymph Nodes in Wistar Rats Sensitized with Casein

The mesenteric lymph nodes were sterile in the control and probiotic groups while casein sensitization caused bacterial translocation ($p < 0.05$). Probiotic gavage completely eliminated bacterial translocation to MLN in rat groups subjected to the casein challenge (Table 4).

Table 4. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes in rats subjected to casein challenge.

Group	Number of Affected Rats	CFU/ MLN of Rat
Control	0/8	0
SL42	0/8	0
DSM17938	0/8	0
Casein	6/8	288 *
Casein + SL42	0/8	0
Casein + DSM17938	0/8	0

Bacterial translocation data are represented as mean of the total CFU cultured from MLN of each rat ($n = 8$) after 48 h of incubation. * $p < 0.05$ compared with controls.

4. Discussion

The most common food allergy in children is cow's milk allergy. There is currently no effective treatment available to prevent or cure food allergies [4]. However, according

to numerous studies, breastfeeding protects the infant from developing allergic diseases, helps young infants' immune systems mature, and protects them from infections [4,29].

There are many immunological components in human milk, such as probiotic bacteria, nondigestible oligosaccharides, secretory IgA, mucins, cytokines, long-chain PUFA, and hormones. Probiotic bacteria, in particular, may support immunocompetence, which is required for adequate capacity to induce oral tolerance, either directly or indirectly through stimulation of beneficial intestinal microbiota [30,31]. The benefits of breastfeeding to newborn health are meaningful, and the microbiome in milk may play a crucial role. In this context, we aimed to investigate the beneficial effects of probiotic bacteria found in human milk that may be associated with improved infant health, and could be incorporated in human milk formula. The goal of this study was to compare the effects of probiotic strains from human milk supplementation on the outcome of the allergic response in rats during oral sensitization with bovine casein. First, the strain SL42 isolated from the breast milk of a young and healthy mother was assessed for probiotic aptitudes and compared with the probiotic strain of *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938. The 16S rRNA analysis showed that the isolate belongs to the *Lacticaseibacillus rhamnosus* species. Kang et al. [32] also obtained two *Lacticaseibacillus rhamnosus* strains from the breast milk of healthy Chinese women, and this bacterial species is known to be one of the most prevalent bacterial species in human milk.

Streptococcaceae, *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Lactobacillaceae*, and *Oxalobacteraceae* are the common bacterial families [33]. In our study, the isolated strain *Lacticaseibacillus rhamnosus* SL42 performed better than DSM 17938, including by having better tolerance to acidity and bile, and antimicrobial ability. For antibiotic susceptibility, both assayed strains showed similar trends, especially for vancomycin resistance, as was previously observed for *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Limosilactobacillus reuteri* species in several studies [34,35]. In general, our isolated SL42 strain passed all the tests to be considered as a safe, well-tolerated, and efficacious probiotic-like strain that is able to contribute to beneficial effects on gut health.

It is known that Lactobacilli are an important part of normal human microbial flora that commonly colonize the mouth, the gastrointestinal tract, and the female genitourinary tract [36]. The scientific community agrees on the importance of strain specificity in the action of probiotic microorganisms on the health of their hosts. According to Xavier-Santos et al. [37], in addition to daily doses, researchers must consider the multiple action mechanisms that are unique to each species/strain.

After being identified, both strains of SL42 and DSM 17938 were included individually in our in vivo casein-induced allergy study. *L. reuteri* DSM 17938 was chosen because it is already delivered as a drug to children for alleviating gastrointestinal symptoms. Numerous clinical studies have suggested that *L. reuteri* may be beneficial in modulating gut microbiota, thereby eliminating infections such as enteric colitis, antibiotic-associated diarrhea, *Helicobacter pylori* infection, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, and chronic constipation. *L. reuteri* reduces the duration of acute infectious diarrhea in both children and adults and relieves abdominal pain in patients with colitis or inflammatory bowel disease [10,36].

To define the proper food allergy model, we proposed an oral sensitization model without an adjuvant that mimicked what happens in humans by using female Wistar rats of juvenile age. We believe that our model is appropriate because the administration of an adjuvant may influence the IgE response or cause a false-positive IgE response with a non allergenic food [37]. *Lacticaseibacillus rhamnosus* SL42 or *L. reuteri* DSM 17938 were given to Wistar rats at 3 weeks of age and the rats were challenged orally with casein. In this second part, macroscopic symptoms after casein gavage, calprotectin, eosinophils, and cytokine-associated CAS-induced allergy, fecal bacteria enumeration, changes in spleen and thymus weights, jejunal tissue and eosinophil infiltration, and bacterial translocation to mesenteric lymph nodes were all examined. During the sensitization period, all rats appeared healthy with similar weights between all the groups. Furthermore, no severe symptoms, such as

death, were observed. One rat in the group sensitized only with casein had a score of 1, six had a score of 2, and one had a score of 3. There were no abnormalities in either the control or probiotic-treated groups. This could indicate that the model proposed herein is mildly allergic, and that, despite causing mild intestinal inflammation, it may have a long-term impact on rat growth and development. In general, both the isolated SL42 strain and *L. reuteri* DSM 17938 acted similarly in vivo.

Stanojevic et al. [29] revealed that early postnatal treatment with *Lactobacillus rhamnosus* LB64 appears to be effective in attenuating TNBS autoimmune encephalomyelitis. Similarly, early colonization with *L. rhamnosus* GG increased the richness and diversity of the colonic microbiota and promoted epithelial cell proliferation, differentiation, and mucosal IgA production in adults [38]. Torii et al. [12] found that *L. acidophilus* L-92 administration inhibited total IgE and OVA-specific IgE production in both in vivo and in vitro studies. Based on their findings, the authors hypothesize that LAB suppresses IgE production via a mechanism other than a shift to Th1-dominant immunity.

In our study, oral administration of probiotic strains from human milk in CAS-sensitized rats could reduce symptom scores, CAS-specific IgE, calprotectin, allergen-specific cytokines, and histamine release levels. Although no specific mechanism could be determined based on these data, our principal aim was to assess the direct role of these strains, and our results seem to be in line with the literature confirming the possibility of alleviating allergy markers through probiotic administration. Neau et al. [39] described the protective effect of the *Lactobacillus salivarius* LA307 strain on sensitization, with a decrease in allergen-specific IgE and allergy. In addition to those findings, Esber et al. [40] demonstrated in mice that giving *Lactobacillus rhamnosus* LA305, *L. salivarius* LA307, or *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* LA308 for 3 weeks after sensitization and challenge altered the composition of the gut microbiota. Cytokine production was significantly reduced by all probiotic strains. According to the authors, the three probiotic strains tested alter immune responses by inducing tolerogenic allergies and anti-inflammatory responses.

S100A8/A9 (calprotectin) is claimed to be a sensitive biomarker for inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, psoriasis, and vasculitis [41]. According to Zhu et al. [42], calprotectin, along with other inflammatory factors, may promote the inflammation seen in mild food allergies. S100A8/A9 is involved in innate immune responses in Baker's asthma pathogenesis and is regulated by TLR4 polymorphisms [43].

We also found that CAS sensitization alone changed the composition of gut microbiota in comparison with the controls, in terms of the relative abundance of LAB, nonspecific bacteria, and *Clostridia* species. Our probiotic bacteria intervention was able to restore beneficial microflora in all probiotic-treated rats. Similarly, Tulyeu et al. [31] recently reported that allergen immunization in a food allergy model induced profound changes in the composition of the gut microbiome. The impact on gut microbiota is a proof of concept in this study, even though rat microbiota cannot be compared to human gut microbiota. However, we believe that several changes in the microbiota caused by the SL42 strain may contribute to or enhance its protective effect. Many anti-inflammatory properties have been reported for *L. reuteri* DSM 17938 in the literature. It generates reuterin, a powerful antimicrobial compound capable of inhibiting the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and protozoa [36]. Furthermore, *L. reuteri* forms a probiotic-rich biofilm, inhibits the production of proinflammatory cytokines, and prevents intestinal overgrowth by other commensals, thereby maintaining a balanced gut environment [36].

The "leaky gut syndrome" and bacterial translocation are considered by some authors as triggering factors for the onset of the disease as they promote chronic systemic inflammation. The most reported health benefits were from oral probiotic administration and fecal microbial transplantation [44]. Therapies that focus on modulating the gut microbiota are a good option for pediatrics, especially because infants have developing microbial communities that are associated with immune system maturation [37]. Interestingly, the two tested probiotic strains were able to abolish bacterial translocation in our allergy model, suggesting that the beneficial effects may be due to gut barrier reinforcement.

5. Conclusions

Human milk is an excellent source of LAB strains, which are commonly used as probiotics. *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain SL42 was isolated from the breast milk of healthy Algerian women. Its probiotic potential was assessed in vitro using *L. reuteri* Protectis DSM 17938 as the reference strain. In summary, our findings show that supplementing juvenile rats with *L. rhamnosus* SL42 induces tolerogenic responses and serves several purposes, from lowering the level of casein-associated allergy parameters to improving macroscopic symptoms and suppressing bacterial translocation to MLN. Its effects were similar to those expressed by the probiotic strain of *L. reuteri* DSM 17938. This research identified a potential probiotic candidate for use in the food and pharmaceutical industries. Clinical studies will be required to confirm these experimental findings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11041030/s1>. Table S1: Sequences producing significant alignments for SL42 isolate compared with other species in NCBI GenBank; Figure S1: Body weight variation (g) before (1st day) and after (58th day) CAS challenge. The values are shown as the means \pm SD (n = 8 rats/group). No significant differences were observed at $p > 0.05$; Table S2: Body temperature ($^{\circ}$ C) variation during CAS challenge. The values are shown as the means \pm SD (n = 8 rats/group). No significant differences were observed at $p > 0.05$; Figure S2: Uric acid levels in sera of rats before (1st day) and after (58th day) CAS challenge. The values are shown as the means \pm SD (n = 8 rats/group). * Significant differences were observed at $p < 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization, H.Z. and K.K.; methodology, K.K.; software, N.B.; validation, H.Z., P.G. and A.R.; formal analysis, K.K. and N.B.; investigation, K.K. and N.B.; resources, P.G. and A.R.; data curation, M.M. and A.R.; writing—original draft preparation, K.K. and H.Z.; writing—review and editing, H.Z. and P.G.; visualization, M.M.; supervision, A.R.; project administration, H.Z.; funding acquisition, H.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, grant number DOOL01UN270120230003.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gray, C.L. Food Allergy in South Africa. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2017**, *17*, 668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yakhlef, M.; Souiki, L. Contribution to the estimation of the prevalence of food allergy in schoolchildren in the city of Guelma (Algeria). *Rev. Fr. D'allergol.* **2021**, *61*, 573–578. [[CrossRef](#)]
3. Luyt, D.; Ball, H.; Makwana, N. BSACI guideline for the diagnosis and 463 management of cow's milk allergy. *Clin. Exp. Allergy* **2014**, *44*, 642–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jensen, S.A.; Fiocchi, A.; Baars, T.; Jordakieva, G.; Nowak-Wegrzyn, A.; Pali-Schöll, I.; Passanisi, S.; Pranger, C.L.; Roth-Walter, F.; Takkinen, F.; et al. Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines update-III-Cow's milk allergens and mechanisms triggering immune activation. *World Allergy Organ. J.* **2022**, *15*, 100668. [[CrossRef](#)]
5. Abdel-Gadir, A.; Stephen-Victor, E.; Gerber, G.; Rivas, M.N.; Wang, S.; Harb, H.; Wang, H.; Li, N.; Crestani, E.; Spielman, S.; et al. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1164–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iweala, O.I.; Nagler, C.R. The microbiome and food allergy. *Annu. Rev. Immunol.* **2019**, *37*, 377–403. [[CrossRef](#)]
7. Zamanillo-Campos, R.; Alonso, L.C.; Martin, M.J.F.; Escusa, P.N.; Fernandez, M.T. Nutritional counseling for cow's milk protein allergy in infants from birth to 2 y of ages: Scoping review. *Nutrition* **2022**, *98*, 111633. [[CrossRef](#)]
8. Feehley, T.; Plunkett, H.; Bao, R.; Hong, S.M.; Cullen, G.; Belda-Ferre, P.; Campbell, E.; Aitoro, R.; Nocerino, R.; Paparo, L.; et al. Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 448–453. [[CrossRef](#)]
9. Wesemann, R.; Nagler, C. The Microbiome, Timing, and Barrier Function in the Context of Allergic Disease. *Immunity* **2016**, *44*, 728–738. [[CrossRef](#)]
10. Łubiech, K.; Twarużek, M. *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *Nutrients* **2020**, *12*, 3783. [[CrossRef](#)]
11. Anjum, J.; Nazir, S.; Tariq, M.; Barrett, K.; Zaidi, A. *Lactobacillus* commensals autochthonous to human milk have the hallmarks of potent probiotics. *Microbiology* **2020**, *166*, 966–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Torii, A.; Torii, S.; Fujiwara, S.; Tanaka, H.; Inagaki, N.; Nagai, H. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol. Int.* **2007**, *56*, 293–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Martorell-Aragonés, A.; Echeverría-Zudaire, L.; Alonso-Lebrero, E.; Boné-Calvo, J.; Martín Muñoz, M.F.; Nevot-Falcó, S.; Piquer-Gibert, M.; Valdesoiro-Navarrete, L. Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol. Immunopathol.* **2015**, *43*, 507–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. An, S.B.; Yang, B.G.; Jang, G.; Kim, D.Y.; Kim, J.; Oh, S.M.; Oh, N.; Lee, S.; Moon, J.Y.; Kim, J.A.; et al. Combined IgE neutralization and *Bifidobacterium longum* supplementation reduces the allergic response in models of food allergy. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 5669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Shida, K.; Takahashi, R.; Iwadate, E.; Takamizawa, K.; Yasui, H.; Sato, T.; Habu, S.; Hachimura, S.; Kaminogawa, S. *Lactobacillus casei* strain shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin. Exp. Allergy* **2002**, *32*, 563–570. [[CrossRef](#)]
16. Murosaki, S.; Yamamoto, Y.; Ito, K.; Ito, K.; Inokuchi, T.; Kusaka, H.; Ikeda, H.; Yoshikai, Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1998**, *102*, 57–64. [[CrossRef](#)]
17. Ziar, H.; Riazi, A. Polysorbate 80 improves the adhesion and survival of yogurt starters with cholesterol uptake abilities. *Saudi J. Biol. Sci.* **2022**, *29*, 103367. [[CrossRef](#)]
18. Ziar, H.; Gérard, P.; Riazi, A. Effect of prebiotic carbohydrates on growth, Bile survival and Cholesterol-lowering activities of dairy-related bacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, *47*, 1421–1429. [[CrossRef](#)]
19. Voulgari, K.; Hatzikamari, M.; Delepoglou, A.; Georgakopoulos, P.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Tzanetakis, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* **2010**, *21*, 136–142. [[CrossRef](#)]
20. Pérez, P.F.; Minnaard, Y.; Disalvo, E.A.; De Antoni, G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 21–26. [[CrossRef](#)]
21. Buxton, R. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. 2005. Available online: <https://www.asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba072aea25a43e76/protocol2885.pdf> (accessed on 19 November 2019).
22. Ziar, H.; Yahla, I.; Riazi, A.; Gérard, P. Ca-Alginate-Carob Galactomannans Beads to Preserve Viability During Digestive Hostility Transit and Cholesterol Uptake Ability of Probiotic Bacteria. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Materials and Sustainable Development, ISMSD 2019*; Benmounah, A., Abadlia, M.T., Saidi, M., Zerizer, A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020.
23. Pereira, D.I.; McCartney, A.L.; Gibson, G.R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4743–4752. [[CrossRef](#)]
24. Zheng, M.; Zhang, R.; Tian, X.; Zhou, X.; Pan, X.; Wong, A. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Plessas, S.; Nouska, C.; Karapetsas, A.; Kazakos, S.; Alexopoulos, A.; Mantzourani, I.; Chondrou, P.; Fournomiti, M.; Galanis, A.; Bezirtzoglou, E. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chem.* **2017**, *226*, 102–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Huang, C.H.; Cheng, J.; Deng, M.C.; Chou, C.H.; Jan, T.R. Prebiotic effect of diosgenin, an immunoactive steroidal sapogenin of the Chinese yam. *Food Chem.* **2012**, *132*, 428–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hink, T.; Burnham, C.A.; Dubberke, E.R. A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens. *Anaerobe* **2013**, *19*, 39–43. [[CrossRef](#)]
28. Song, H.; Zhang, S.; Zhang, L.; Li, B. Effect of orally administered collagen peptides from bovine bone on skin aging in chronologically aged mice. *Nutrients* **2017**, *9*, 1209. [[CrossRef](#)]
29. Stanojević, S.; Blagojević, V.; Ćuruvija, I.; Veljović, K.; Bajić, S.S.; Kotur-Stevuljević, J.; Bogdanović, A.; Petrović, R.; Vujnović, I.; Kovačević-Jovanović, V. Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* 64 during the early postnatal period improves the health of adult rats with TNBS-induced colitis. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 92–105. [[CrossRef](#)]
30. Muraro, A.; Halken, S.; Arshad, S.H.; Beyer, K.; Dubois, A.E.; Du Toit, G.; Eigenmann, P.A.; Grimshaw, K.E.; Hoest, A.; Lack, G.; et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy* **2014**, *69*, 590–601. [[CrossRef](#)]
31. Tulyeu, J.; Kumagai, H.; Jimbo, E.; Watanabe, S.; Yokoyama, K.; Cui, L.; Osaka, H.; Mieno, M.; Yamagata, T. Probiotics Prevents Sensitization to Oral Antigen and Subsequent Increases in Intestinal Tight Junction Permeability in Juvenile-Young Adult Rats. *Microorganisms* **2019**, *7*, 463. [[CrossRef](#)]
32. Kang, W.; Pan, L.; Peng, C.; Dong, L.; Cao, S.; Cheng, H.; Wang, Y.; Zhang, C.; Gu, R.; Wang, J.; et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 9980–9991. [[CrossRef](#)]
33. Moossavi, S.; Azad, M.B. Origins of human milk microbiota: New evidence and arising questions. *Gut Microbes* **2019**, *12*, 1667722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Campedelli, I.; Mathur, H.; Salvetti, E.; Rea, M.C.; Torriani, S.; Ross, R.P.; Hill, C.; O'Toole, P.W. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01738-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, S.; Oh, J.-H.; Alexander, L.M.; Özçam, M.; Van Pijkeren, J.P. D-alanyl-dalanine ligase as a broad-host-range counter selection marker in vancomycin resistant lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **2018**, *200*, e00607–e00617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Saviano, A.; Mattia Brigida, O.; Migneco, A.; Gunawardena, G.; Zanza, C.; Candelli, M.; Franceschi, F.; Ojetti, V. *Lactobacillus Reuteri* DSM 17938 (*Limosilactobacillus reuteri*) in Diarrhea and Constipation: Two Sides of the Same Coin? *Medicina* **2021**, *57*, 643. [[CrossRef](#)]
37. Pilegaard, K.; Madsen, C. An oral Brown Norway rat model for food allergy: Comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology* **2004**, *196*, 247–257. [[CrossRef](#)]
38. Yan, F.; Liu, L.; Cao, H.; Moore, D.J.; Washington, M.K.; Wang, B.; Peek, R.; Acra, S.; Polk, D. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood. *Mucosal Immunol.* **2017**, *10*, 117–127. [[CrossRef](#)]
39. Neau, E.; Delannoy, J.; Marion, C.; Cottart, C.H.; Labellie, C.; Holowacz, S.; Butel, M.-J.; Kapel, N.; Waligora-Dupriet, A.-J. Three novel candidate probiotic strains with prophylactic properties in a murine model of cow's milk allergy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 1722–1733. [[CrossRef](#)]
40. Esber, N.; Mauras, A.; Delannoy, J.; Labellie, C.; Mayeur, C.; Caillaud, M.A.; Kashima, T.; Souchaud, L.; Nicolis, I.; Kapel, N.; et al. Three candidate probiotic strains impact gut microbiota and induce anergy in mice with cow's milk allergy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01203–e01220. [[CrossRef](#)]
41. Okada, K.; Itoh, H.; Ikemoto, M. Circulating S100A8/A9 is potentially a biomarker that could reflect the severity of experimental colitis in rats. *Heliyon* **2020**, *6*, e03470. [[CrossRef](#)]
42. Zhu, Q.; Li, F.; Wang, J.; Ma, J.; Sheng, X. Upregulation of calprotectin in mild IgE-mediated ovalbumin hypersensitivity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 37342–37354. [[CrossRef](#)]
43. Pham, D.L.; Yoon, M.G.; Ban, G.Y.; Kim, S.H.; Kim, M.A.; Ye, Y.M.; Shin, Y.S.; Park, H.S. Serum S100A8 and S100A9 Enhance Innate Immune Responses in the Pathogenesis of Baker's Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2015**, *168*, 138–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sato, K.; Takahashi, N.; Kato, T.; Matsuda, Y.; Yokoji, M.; Yamada, M.; Nakajima, T.; Kondo, N.; Endo, N.; Yamamoto, R.; et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered *Porphyromonas gingivalis* through modulation of the gut microbiota and gut immune system. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.