



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

DANSOKO Siriman

Et

CISSE Anselme

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Spécialité : Biochimie Appliquée

THÈME

Etude de quelques paramètres du
statut redox chez des souris Balb/c
rendues allergiques à la bêta-
lactoglobuline et à l'ovalbumine

Soutenue publiquement le 29/06/2020

DEVANT LE JURY

Président :	Mr BENAKRICHE B.	Professeur	Université de Mostaganem
Encadreure :	Mme GRAR H.	Maître de Conférences B	Université de Mostaganem
Examinatrice :	Mme DOUICHENE S.	Maître de Conférences B	Université de Mostaganem
Examinatrice :	Mme BENAÏSSA Y.	Maître de Conférences B	Université d'Oran 1

Thème réalisé au laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire

DEDICACES :

Par la grâce de YHWH, Dieu Le Tout Puissant ce travail a pu être réalisé ;

A la mémoire de mon père, qui m'a toujours soutenu, conseillé et encouragé dans mes études.

A ma mère, qui veille toujours sur mon bien-être, pour l'affection qu'elle manifeste à mon égard ;

A la toute la famille SAMAKE, pour leur contribution, leur soutien et encouragements continus ;

A tous mes frères et sœurs, amis et proches je vous dédie ce modeste travail.

DANSOKO Siriman.

DEDICACES

Je dédie ce travail

A Dieu le Tout Puissant, Maître du temps et des circonstances, plein d'amour, de tendresse et de bonté,

A ma mère CISSE Fatoumata pour qui aucun mot ne pourra exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous.

Personne ne pourra vous rendre les sacrifices que vous avez déployés à mon égard.

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

A la mémoire de mon père feu Michel que je n'oublierai jamais et qui depuis mon enfance a suscité en moi le goût à l'effort de par sa rigueur,

A vous mes frères et sœurs pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour votre soutien, votre compréhension et vos encouragements...

A mes tantes, mes tontons et mes cousins pour tout leur soutien durant ces années d'études,

Mes amis(es) et mes proches de la C.10 je vous dédie ce modeste travail, avec tous mes souhaits de bonheur, réussite et bonne santé.

A tous ceux qui sont chers et que j'ai omis involontairement de citer...

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi.

CISSE Anselme

REMERCIEMENT :

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire sous la direction de Monsieur Djamel SAIDI, Professeur de Physiologie à l'Université d'Oran 1. Que Monsieur SAIDI et Monsieur KHEROUA veuillent accepter nos remerciements les plus sincères pour nous avoir accueilli au sein de leur équipe de recherche.

A Madame Hadria GRAR, Maître de conférences B à l'Université de Mostaganem

Un grand Merci ! Pour la confiance que vous nous avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail. Merci pour vos encouragements, vos conseils ainsi que tous les efforts que vous avez fournis afin de mener à bien ce travail. Veuillez recevoir nos sincères reconnaissances.

A Monsieur Benmhel BENAKRICHE, Professeur à l'Université de Mostaganem

Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury. Nous vous en sommes reconnaissant d'avoir accepté de juger notre travail. Que vous receviez l'expression de nos hommages très respectueux.

A Madame Salima DOUICHENE, Maître de conférences B à l'Université de Mostaganem

Nous tenons à vous exprimer nos profonds remerciements d'avoir bien voulu agir en tant qu'examinatrice. Nous vous prions de croire en notre respectueuse considération.

A Madame Yamina BENAÏSSA, Maître de conférences B à l'Université d'Oran 1

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce modeste travail. Veuillez accepter tous nos remerciements et l'expression de notre profonde reconnaissance.

Que tout le personnel du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire trouve ici nos vifs remerciements.

Nous tenons également à remercier toute notre promotion de Master, sans exception, pour nous avoir manifesté Respect et considération durant tout notre parcours.

Résumé

L'allergie alimentaire fait interagir le système immunitaire associé à l'intestin et est fréquemment associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules immunitaires. **L'objectif** de ce travail est d'étudier l'effet de la sensibilisation à la bêta-lactoglobuline (BLG) ou à l'ovalbumine (OVA) sur le niveau de stress oxydant chez des souris Balb/c.

Pour cela, 18 souris femelles âgées de 5 semaines sont réparties en 3 groupes de 6 souris chacun. Le premier lot est constitué de souris immunisées à la BLG. Le second lot est constitué de souris sensibilisées à l'OVA. Et le troisième lot, constitué de souris ne recevant aucun allergène, est le groupe contrôle. Les sensibilisations sont faites par voie intrapéritonéale, en injectant une dose de 10 µg de BLG et 5 µg d'OVA respectivement mélangées à 2 mg d'adjuvant (Al(OH)₃). Le lien entre stress oxydant et allergie alimentaire est déterminé par évaluation de la lipoperoxydation par dosage des TBARS et du pouvoir réducteur (technique de FRAP) au niveau tissulaire (foie et intestin) et plasmatique. Un dosage des protéines totales par la technique de Lowry a été également effectué au niveau tissulaire.

Nos résultats montrent que :

- La sensibilisation à la BLG augmente significativement la peroxydation lipidique au niveau tissulaire, reflétée par une augmentation du taux des TBARS au niveau intestinal ($p < 0,05$).
- La sensibilisation à l'OVA augmente considérablement la peroxydation lipidique, mais cette fois-ci uniquement au niveau plasmatique.
- La sensibilisation aux allergènes (BLG et OVA) ne semble pas affecter le pouvoir réducteur ni au niveau tissulaire, ni au niveau plasmatique.

L'ensemble de ces résultats prouve que les allergènes alimentaires pourraient jouer un rôle dans la survenue d'un stress oxydant par augmentation des espèces réactives de l'oxygène.

Mots clés : Stress oxydant, Allergie alimentaire, ROS, Antioxydants, BLG, OVA, Balb/c, TBARS, FRAP.

Abstract

Food allergy reaction involves the immune system associated with the gut and is frequently associated with an increase in the production of reactive oxygen species by immune cells. The **aim** of this study is to determine the effect of sensitization to beta-lactoglobulin (BLG) or to ovalbumin (OVA) on certain parameters of oxidative stress in Balb/c mice.

For this, 18 female mice aged 5 weeks are divided into 3 groups of 6 mice in each group. The first and the second group are respectively sensitized to BLG and ovalbumin. The third group, consisting of mice receiving no allergens, represents the control group. The sensitizations are made intraperitoneally, by injecting a dose of 10 µg of BLG and 5 µg of OVA respectively mixed with 2 mg of adjuvant (Al(OH)₃). The relationship between oxidative stress and food allergy is determined by evaluation of lipoperoxidation, by assaying TBARS and reducing power (FRAP technique) in plasma, liver and intestine tissues. A determination of total proteins by the Lowry technique was also carried out at the tissue level.

Our results show that :

- Sensitization with BLG significantly increased intestinal lipid peroxidation, reflected by an increase of TBARS levels ($p < 0.05$).
- Sensitization with OVA significantly increased lipid peroxidation, but this time only at the plasma level.
- Sensitization to allergens (BLG and OVA) does not seem to affect the reducing power either at the tissue level or at the plasma level.

These results prove that food allergens could play a main role in the occurrence of oxidative stress by increasing reactive oxygen species.

Keywords: Oxidative stress, Food allergy, ROS, Antioxidants, BLG, OVA, Balb/c, TBARS, FRAP.

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Classification des hypersensibilités alimentaires.....	3
Figure 2 : Processus de la peroxydation lipidique.....	12
Figure 3 : Teneur en TBARS intestinal et hépatique des souris Balb/c sensibilisées à la BLG ou à l'OVA.....	19
Figure 4 : Teneur en TBARS plasmatique des souris Balb/c sensibilisées à la BLG ou à l'OVA.....	20
Figure 5 : Effet de la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA sur le pouvoir réducteur hépatique et intestinal des souris Balb/c.....	21
Figure 6 : Effet de la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA sur le pouvoir réducteur plasmatique des souris Balb/c.....	22
Figure 7 : Teneur en protéines totales au niveau intestinal et hépatique des différents groupes de souris.....	23
Tableau 1 : Les principales espèces ROS et RNS générées dans les systèmes biologiques.....	8

LISTE DES ABREVIATIONS

AGPI	Acide gras polyinsaturé
Al(OH)₃	Hydroxyde d'aluminium
APLV	Allergie aux protéines du lait de vache
ATP	Adénosine triphosphate
BLG	β-lactoglobuline
CAT	Catalase
Cys	Cystéine
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
FRAP	Pouvoir antioxydant du fer réduit (Ferric Reducing Antioxidant Power)
Gal d	Gallus domesticus
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
HNE	Hydroxynonéol
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
KDa	Kilo dalton
LB	Lymphocyte B
MDA	Malonyldialdéhyde
mg	Milligramme
min :	Minute
ml :	Millilitre
mM :	Milli molaire
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nm :	Nanomètre
OVA	Ovalbumine
pH	Potentiel d'hydrogène
RNS	Espèces réactives de l'azote (Reactive nitrogen species)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)

SAB	Sérum albumine bovine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
Th	Lymphocyte T auxiliaire (T helper)
TPTZ	Tripyridyl -triazine
UV	Ultraviolet
WAO	Organisation mondiale de l'allergie (World Allergy Organization)
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
µmol :	Micromole

Table des matières

Introduction	1
Rappels bibliographiques	
I. Allergie alimentaire :	2
I.1. Classification :.....	2
I.2. Mécanisme :.....	2
I.2.1. Phase de sensibilisation :.....	4
I.2.2. Phase du déclenchement :	4
I.3. L'Allergie aux protéines du lait de vache (APLV) :.....	4
I.3.1. La bêta-lactoglobuline (BLG) :	5
I.4. L'allergie à l'œuf :	5
II. Stress oxydant :	6
II.1. Notion de radicaux libres :	6
II.2. Principales sources des radicaux libres :	7
II.2.1. Source endogène :	7
II.2.2. Sources exogènes :.....	9
II.3. Dommages moléculaires induits par les radicaux libres :.....	10
II.3.1. La peroxydation lipidique :.....	10
II.3.1.a. L'initiation :.....	11
II.3.1.b. La propagation :	11
II.3.1.c. La terminaison :	11
II.4. La défense cellulaire antioxydante :.....	11
II.4.1. Définition d'un antioxydant :.....	11
II.4.2. Antioxydants enzymatiques :	13
II.4.2.a. La superoxyde dismutase (SOD) :.....	13
II.4.2.b. La catalase (CAT) :.....	13
II.4.2.c. La glutathion peroxydase (GPX) :.....	13

Matériel et Méthodes

I. Animaux :	15
I.1. Répartition des animaux :	15
I.2. Protocole d'immunisation :	15
I.3. Rôle de l'adjuvant :	15
I.4. Prélèvement des échantillons sanguins et tissulaires :	15
II. Evaluation de certains paramètres du statut redox :	16
II.1. Détermination de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :	16
II.1.1. Principe :	16
II.1.2. TBARS au niveau plasmatique :	16
II.1.3. TBARS au niveau tissulaire :	16
II.2. Le test du pouvoir réducteur (FRAP) :	17
II.3. Détermination des teneurs en protéines totales du foie et de l'intestin :	17

Résultats

I. Effet de la sensibilisation sur la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :	18
I.1. Au niveau tissulaire :	18
I.2. Au niveau plasmatique :	18
II. Test de pouvoir réducteur (FRAP) :	18
III. Teneur en protéines totales du foie et de l'intestin :	18
Discussion	24
Conclusion	26

Introduction générale

Introduction :

Au cours des récentes années, l'allergie alimentaire et d'autres maladies apparentées ont rapidement augmenté dans les pays développés et en voie de développement, avec une prévalence se situant entre 1,1 à 10% chez les enfants (**Savage et Jones, 2015 ; Burden, 2017**). Il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité (**Wal, 2011**) pouvant impliquer des mécanismes IgE et non IgE-médiés ou encore mixtes (**Koletzko et al., 2012 ; Huang et al., 2018**). Le diagnostic de l'allergie alimentaire se repose principalement sur les signes cliniques. Il est également important d'identifier les allergènes mis en cause grâce à une enquête approfondie des antécédents cliniques (**Turnbull et al., 2015**). Le régime peut jouer un rôle, à la fois dans la prévention et la gestion d'une allergie alimentaire (**Mazzocchi et al., 2017**).

Le seul traitement des symptômes qui s'est avéré efficace est l'éviction, mais cela nécessite une discipline rigoureuse dans le contrôle de l'alimentation. En effet, le risque est plus important pour les consommateurs de produits transformés, qui contiennent souvent une variété d'ingrédients, répertoriés sur des étiquettes pas toujours faciles à interpréter (**Diaz-amigo et Popping, 2019**).

Le stress oxydant survient lorsqu'il y a déséquilibre entre pro-oxydant et antioxydant en faveur des espèces radicalaires.

Le lien entre le stress oxydant et les maladies allergiques demeure un sujet très controversé au sein de la communauté scientifique, car les études qui s'y intéressent ont rapporté des résultats très variables. Toutefois, plusieurs d'entre elles sont en faveur de l'implication des radicaux libres dans la pathogénèse des maladies allergiques. Cela nous amène donc à se demander s'il existe un lien direct entre le stress oxydant et les maladies allergiques.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) participent de manière contrôlée à la réponse allergique en modulant la réponse cellulaire ainsi que l'interaction entre les cellules (**Leonie et al., 2017**). En effet, certains allergènes sont capables de déclencher la production des (ROS), et par conséquent, le stress oxydant.

Ce travail est effectué dans le but d'étudier quelques paramètres de stress oxydatif chez des souris Balb/c rendues allergiques à la bêta-lactoglobuline (BLG) et à l'ovalbumine (OVA).

Rappels
Bibliographiques

I. Allergie alimentaire :

Le terme allergie alimentaire correspond à l'ensemble des manifestations d'une réponse immunitaire anormale suite à l'introduction d'allergènes (trophallergènes) par la nourriture. Un ensemble de troubles est déclenché après la consommation de certains aliments chez les personnes sensibles à ces allergènes (**Jones et Burks, 2017**). Chez ces personnes, l'allergie est liée à la présence d'anticorps spécifiques des antigènes alimentaire dans le sérum et fréquemment associée à des taux élevés d'immunoglobuline E (IgE) sérique (**Thijs et al., 2011**).

Au cours de ces dernières années, sa prévalence a augmenté, notamment dans les pays développés et en développement, avec 1-2 % d'adultes et 4-8 % d'enfants (**Prescott et al., 2013 ; Savage et Johns 2015**). L'enfant est surtout allergique aux allergènes dits « majeurs » tels que le lait de vache et l'œuf de poule (**Sicherer et Sampson, 2007**).

I.1. Classification :

Il est important de faire la distinction entre l'allergie alimentaire dite « vraie » et celle dite « fausse ». La première implique le développement d'un mécanisme immuno-allergique pouvant être associé ou non à la production d'IgE ; alors que la seconde, aussi appelée « intolérance alimentaire », ne nécessite pas d'intervention du système immunitaire même si les manifestations cliniques peuvent se révéler similaires à celles des vraies allergies.

Selon l'Organisation Mondiale d'Allergie (WAO : World Allergy Organization), les réactions indésirables aux aliments doivent être nommées « hypersensibilités alimentaires », et les intolérances alimentaires doivent être définies en tant qu'« hypersensibilités alimentaires non allergiques» (**Johansson et al., 2004**) (**Figure 1**).

I.2. Mécanisme :

Le système immunitaire joue un rôle fondamental dans le développement -ou le non développement- d'une allergie alimentaire.

Il est essentiel que le système immunitaire reconnaisse l'allergène alimentaire comme non pathogène afin d'établir une tolérance immunitaire et clinique. La perte de cette tolérance entraîne une allergie alimentaire et, par la suite, induit une réponse inflammatoire exagérée du système immunitaire (**Yu et al., 2016**).

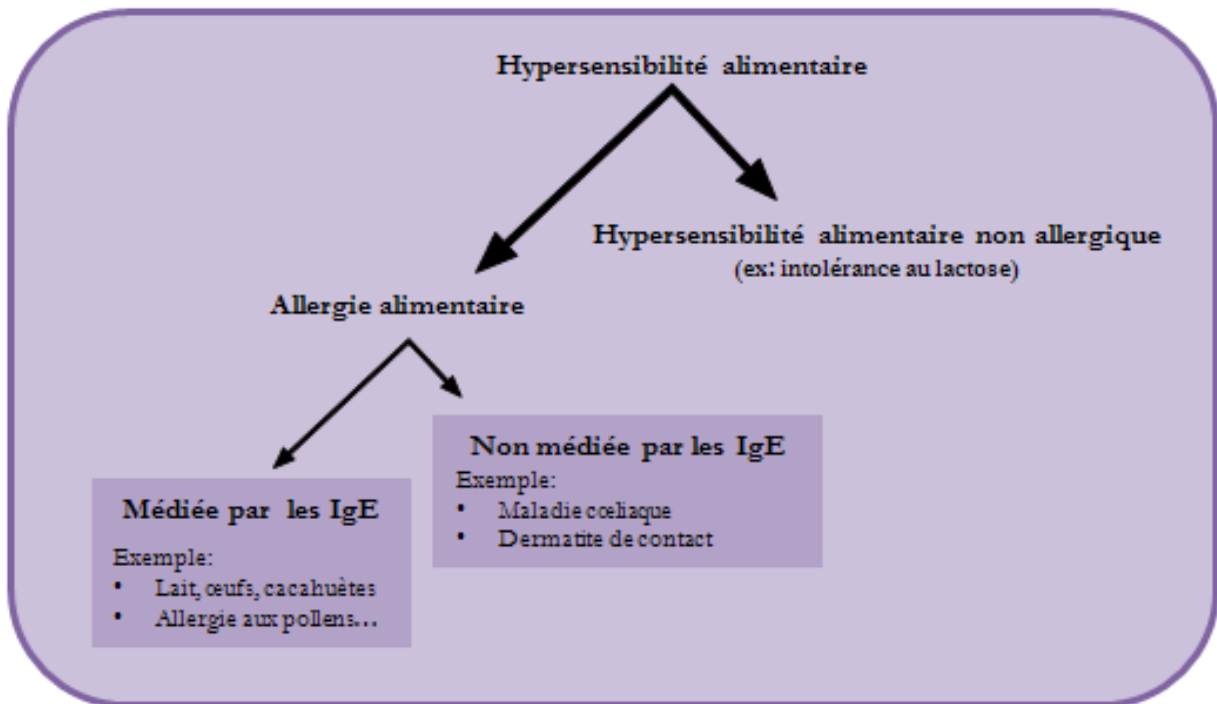


Figure 1 : Classification des hypersensibilités alimentaires (Johansson et al., 2004).

Le mécanisme fondamental de la réaction allergique immédiate dépendante des IgE se déroule en deux phases : la phase de sensibilisation et la phase du déclenchement. Dans le cas des allergies alimentaires chez l'enfant, la sensibilisation se produit au niveau du tractus gastro-intestinal. La caractérisation des aliments concernés (lait de vache, œuf) se fait donc par leur résistance aux processus digestifs (**Han et al., 2012**).

I.2.1. Phase de sensibilisation :

Au cours de cette phase, la tolérance alimentaire se dégrade à la suite de l'exposition aux trophallergènes ou à la suite de lésions épithéliales, conduisant à la production d'interleukines (IL-25, IL-33...). Sous ces conditions, l'induction des Treg est modifiée et commutée vers les Th2 spécifiques de l'allergène qui, en sécrétant les interleukines (IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13), induisent la transformation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes sécréteurs d'IgE spécifiques et stimulent ainsi l'expansion des mastocytes. Les IgE se lient aux récepteurs présents à la surface des mastocytes et des basophiles (**Iweala et Burks, 2016**).

I.2.2. Phase du déclenchement :

Lors de l'exposition au même allergène alimentaire, celui-ci est reconnu par les IgE spécifiques liés aux cellules effectrices via leurs récepteurs. Il en résulte une dégranulation cellulaire, libérant des médiateurs, comme l'histamine génératrice des symptômes d'allergie à médiation IgE (**Iweala et Burks, 2016**).

I.3. L'Allergie aux protéines du lait de vache (APLV) :

L'APLV est une réaction immunitaire aux protéines présentes dans le lait de vache. Les protéines de lait peuvent être ingérées directement en buvant une formule à base de lait de vache ou transmises par le lait maternel (**Fiocchi et al., 2010**). Cette allergie est principalement une hypersensibilité immédiate médiée par les IgE, mais elle peut également faire intervenir d'autres classes d'anticorps et/ou des mécanismes cellulaires responsables de manifestations retardées voire chroniques (**Wal, 2011**). Dans le cas d'une intolérance au lait de vache, il est généralement question d'un déficit en lactase qui est rare chez les nourrissons. (**Vandenplas et al., 2014**).

L'APLV est la première allergie rencontrée au cours de la vie, le lait étant le premier aliment consommé. Ceci explique pourquoi cette allergie touche surtout les nourrissons et les enfants, avec une prévalence de 0,5 à 6% (**Koletzko et al., 2012**).

En effet, chez la plupart des enfants, les symptômes apparaissent avant l'âge d'un an, parfois par l'introduction de formule infantile à base du lait de vache une semaine après le

sevrage. Benhamou et ses collaborateurs ont cependant montré que l'on peut développer de l'APLV à tous les âges (**Benhamou et al., 2009**).

I.3.1. La bêta-lactoglobuline (BLG) :

Principale protéine du lactosérum bovin, la bêta-lactoglobuline est la seule protéine du lait de vache à n'avoir pas d'équivalent dans le lait maternel et la plus allergisante (**Boutin et al., 2015**).

La BLG bovine représente 10 % de la fraction protéique du lait de vache et 50 % de celle du lactosérum (**Sawyer et Kontopidis, 2000**).

Au pH du lait (pH 6,8), la BLG est un dimère de 36 kDa ; chaque unité étant composée de 162 acides aminés. Les monomères contiennent chacun deux ponts disulfures localisés entre les résidus Cys66 et Cys160, Cys106 et Cys119 ou Cys121. Un groupement thiol libre (-SH) se trouve positionné sur le résidu Cys119 ou Cys121.

La structure secondaire de la BLG est constituée de 10-15% d'hélice- α , 43% de feuillets- β , et de 47% de structures désordonnées (**Sawyer et Kontopidis, 2000**).

Dans sa structure tertiaire, les feuillets- β forment une cavité centrale hydrophobe, d'où sa classification dans la famille des lipocalines. Cette structure lui confère une bonne résistance à l'hydrolyse acide et à la pepsine gastrique (**Asselin et al., 1989 ; Reddy et al., 1998**). La BLG est alors adsorbée au niveau du grêle à l'état natif ou légèrement hydrolysée, ce qui explique, en partie, sa forte allergénicité (**Schmidt et al., 1995**).

I.4. L'allergie à l'œuf :

De nos jours, l'œuf de poule fait partie des aliments fréquemment consommés, et à la base de nombreuses préparations culinaires dans plusieurs pays. Il est considéré comme une bonne source de protéines et de lipides chez les nourrissons. Néanmoins, suite à l'émergence et la prise de conscience des allergies alimentaires, l'œuf s'est rapidement avéré être la source de nombreuses réactions.

L'allergie alimentaire à l'œuf de poule est l'une des plus fréquentes allergies alimentaires de l'enfant (**Rancé et al., 2005**). Sa prévalence dans la population générale est estimée entre 1,3 et 1,7%. Il s'agit, le plus souvent, d'une allergie IgE médiée. Ceci n'exclut pas le fait qu'il y ait souvent des formes non-IgE, notamment dans les cas d'œsophagites à éosinophiles (**Benhamou et al., 2010**).

En règle générale, l'allergie apparaît suite à l'ingestion de produits contenant des protéines de l'œuf, bien que d'autres voies soient possibles, comme le simple contact cutané et/ou d'une muqueuse avec des protéines de l'œuf. Cependant, la réaction au contact cutané d'un œuf n'est pas corrélée à une réaction à l'ingestion de l'œuf. En effet, certains enfants qui présentent une urticaire de contact en touchant l'œuf cru peuvent consommer des produits à base d'œuf sans avoir par la suite de manifestations (**Eigenmann, 2000 ; Kemp, 2007**).

L'œuf de poule est composé de trois éléments : une coquille non allergisante (8-11%), le blanc (55-61%) et le jaune (27-32%). Les allergènes du blanc, partie la plus allergisante, sont nombreux puisqu'il existe 23 protéines dont les allergènes majeurs : Gal d1 (Ovomucoïde), Gal d2 (ovalbumine), Gal d3 (ovotransferrine) et Gal d4 (lysozyme) (**Benhamou et al., 2010**).

L'ovalbumine, avec un poids moléculaire de 44,5 kDa, est la fraction protéique la plus importante avec environ 54 % des protéines totales du blanc d'œuf. Elle est également considérée comme le deuxième allergène majeur de l'œuf de poule, après l'ovomucoïde (**Bernhisel et al., 1994 ; Cooke et Sampson, 1997**).

II. Stress oxydant :

Le stress oxydatif a été défini pour la première fois en 1985 par Sies comme « une perturbation de l'équilibre antioxydant en faveur des espèces oxydantes, conduisant à des dommages potentiels ». L'introduction de ce concept aboutit au développement de la biologie redox, un nouveau domaine de recherche en biologie (**Persson et al., 2014 ; Sies, 2015**).

Le concept moderne du stress oxydatif comprend plus de détails : « le déséquilibre entre la production des espèces réactives oxygène/azote (ROS/RNS) et la capacité de l'organisme à contrer leur action par les systèmes de protection antioxydants » (**Pisoschi et Pop, 2015**). Ces systèmes impliquent, en général, l'action de diverses enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion (GSH) (**Maritim et al., 2003**).

II.1. Notion de radicaux libres :

Tous les organismes aérobies dépendent de la génération d'ATP à partir de l'énergie électrochimique produite par la réduction à quatre électrons de l'oxygène moléculaire dans l'eau. Au cours de ce processus, la chaîne de transport mitochondriale peut perdre des électrons, entraînant la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, le dysfonctionnement mitochondrial peut aggraver la perte d'électrons et ainsi augmenter la production de ROS à des niveaux toxiques perturbant l'homéostasie redox (**Kalyanaraman, 2013**).

Les radicaux libres ont des rôles physiologiques dans de nombreuses voies moléculaires, y compris celles de la signalisation cellulaire, de la plasticité synaptique, de la formation de mémoire, de la défense contre les agents envahisseurs, des interactions cellule-cellule, de la croissance cellulaire, de l'autophagie, des processus apoptotiques et du vieillissement (**Brown et al., 2004 ; Bokkon, 2012 ; Halliwell et Gutteridge, 2015 ; Angelova et Abramov, 2018**).

Il existe différents types d'espèces réactives (**Tableau 1**), pouvant dériver soit de la molécule d'oxygène telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des molécules d'azotes telles que les espèces réactives de l'azote (RNS) (**Halliwell et Gutteridge, 2015**). Toutefois, certains métaux lourds tels que le fer (ferrique) et le cuivre peuvent aussi avoir des propriétés radicalaires (**Tangvarasittichai, 2015**).

Chimiquement, l'oxydation est la perte d'un électron, tandis que la réduction en est un gain. Ceci reflète la tendance de l'oxygène, un atome hautement électronégatif, à arracher partiellement ou totalement un électron à d'autres molécules. Les espèces réactives à l'oxygène sont des atomes ou des molécules avec un seul électron non apparié, comprenant, entre autre, le superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyle (HO°) et le radical peroxyde lipidique (LOO°). Bien que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne soit pas un radical libre, il est un précurseur de HO° . De même, il a été prouvé que le rayonnement UV ainsi que la présence d'ions métalliques (Fe^{2+} , Fe^{3+} , et Cu^{2+}) génèrent du HO° (**Kalyanaraman et al., 2013 ; Kalyanaraman et al., 2018**).

Ces éléments hyperactifs peuvent ainsi se lier à d'autres biomolécules et les modifier par la suite (**Radi et al., 2018**).

II.2. Principales sources des radicaux libres :

Les sources des espèces réactives sont classées en deux catégories : source endogène et source exogène.

II.2.1. Source endogène :

La production intracellulaire des radicaux libres découle de plusieurs sources essentiellement d'origine enzymatique.

Le transport des électrons dans la chaîne mitochondriale est reconnu comme la source principale des ROS dans les cellules animales en aérobose (**Halliwell et Gutteridge, 2008**).

Tableau 1 : Les principales espèces ROS et RNS générées dans les systèmes biologiques
(Bartosz, 2003)

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	OH°
Monoxyde d'azote	NO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Radical alcoxy	RO
Radical peroxy	ROO^-

Bien que la cytochrome oxydase ne produit pas de ROS, certains composants de la chaîne mitochondriale qui la précèdent font fuir les électrons de manière constante, réduisant directement l'oxygène (O₂) ambiant en superoxyde O₂^{o-} au lieu d'être transmis aux composants suivants (**Halliwell et Gutteridge, 2008 ; Wu et al., 2011**). Le donneur d'électrons est généralement le NADH ou le NADPH, et la réaction est catalysée par diverses oxydases (NADPH oxydases, xanthine oxydase et le complexe I/II/III/IV des mitochondries).

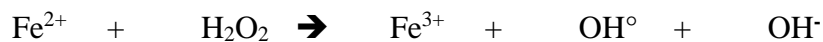
La génération de H₂O₂ se produit après la dismutation de O₂^{o-}, principalement catalysée par les superoxydes dismutases, bien qu'une faible quantité se produise spontanément. Certaines oxydases ont également une activité dismutase et peuvent contribuer à la production directe de peroxyde à partir de superoxyde.

La réaction de O₂^{o-} avec des métaux de transition réduits peut aussi conduire à la formation de H₂O₂. La majeure partie de OH^o est générée à partir de H₂O₂ et O₂^{o-} dans une réaction catalysée par un ion métallique (fer ou cuivre), c'est ce qu'on appelle la réaction de Habor-Weiss. Cette réaction se déroule en deux étapes :

Dans la première étape, le superoxyde réduit le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) :



La deuxième étape correspond à la réaction de Fenton ou le Fe²⁺ réagit avec H₂O₂ pour générer de l'OH^o et OH⁻ :



(**Zhang et al., 2019**)

De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs autres systèmes biologiques, notamment les cellules endothéliales, neuronales et phagocytaires (macrophages) (**Ansari, 1997**).

II.2.2. Sources exogènes :

De nombreux facteurs exogènes liés à l'environnement et à la vie quotidienne sont à l'origine du stress oxydant, par accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ils sont surtout d'origine physique et chimique ; notamment les radiations ionisantes, la radiolyse de l'eau, les réactions photochimiques, les produits chimiques, la cigarette et polluants industriels (**Martinez-Cayuela, 1995 ; Chen et al., 2012**).

II.3. Dommages moléculaires induits par les radicaux libres :

Lorsque la génération des radicaux libres dépasse la plage physiologique normalement tolérée, il y'aura une défaillance du système antioxydant des cellules, ce qui entraîne un stress oxydatif (**Angelova et Abramov, 2018**). Il en résulte l'oxydation des protéines, des lipides (peroxydation lipidique) voire des acides nucléiques (**Radi et al., 2018**) conduisant à un dysfonctionnement tissulaire ainsi que des altérations et cassures des structures de molécules biologiques (**Sies et al., 2017**).

Au cours de ces dernières décennies, les recherches ont prouvé l'implication des ROS dans la physiopathologie de diverses maladies, entre autres, les troubles liés à l'âge tels que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies rénales chroniques et les maladies pulmonaires obstructives chroniques. D'autres études ont montré leur implication dans des maladies comme l'arthrite, l'athérosclérose, le diabète et le cancer (**Liu et al., 2014 ; Liguori et al., 2018**).

II.3.1. La peroxydation lipidique :

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), contenant deux doubles liaisons ou plus, sont facilement oxydés par les ROS pour produire des radicaux peroxyde et hydroperoxyde lipidiques au niveau des parois vasculaires. Ce processus, appelé peroxydation lipidique, peut se produire par voie enzymatique et non enzymatique. Cependant, dans les deux cas, la molécule lipidique est oxydée lors de la formation de radicaux lipidiques (**Klaunig et al., 2011**).

Les initiateurs de la voie non enzymatique sont principalement des radicaux hydroxyle et hydroperoxyde qui déclenchent des réactions oxydantes en chaîne. Les principaux phospholipides membranaires susceptibles de subir une peroxydation sont ceux qui contiennent des AGPI, notamment les acides arachidonique, linoléique, linoléique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque (**Halliwell et Chirico, 1993**).

Bien que des travaux aient montré l'implication des phospholipases dans le métabolisme lipidique (**Adibhatla et Hatcher, 2006**), les principales enzymes catalysant la peroxydation lipidique enzymatique restent les cyclooxygénases (COX) et les lipoxygénases (LOX) (**Brash, 2015 ; Liu et al., 2015**).

Les produits de peroxydation lipidique affectent directement les propriétés physiques et fonctionnelles des membranes cellulaires, en interrompant leur asymétrie lipidique, ce qui réduit l'hydrophobie de l'intérieur de la membrane provoquant une dépolarisation (**Sen et al.,**

2006) et par la suite entraîne une perte de l'intégrité membranaire (Wong-Ekkabut et al., 2007).

Parmi les produits formés lors de la peroxydation, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été utilisés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Del Rio et al., 2005).

D'une manière générale, le mécanisme de peroxydation lipidique consiste en une réaction en chaîne impliquant trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 2).

II.3.1.a L'initiation :

Lors de la première étape, des pro-oxydants, comme le radical hydroxyle, arrachent l'hydrogène allylique. Il se forme un radical lipidique (L°) centré sur le carbone.

II.3.1.b La propagation :

Le radical lipidique formé lors de la phase d'initiation réagit avec l'oxygène et génère un nouveau radical peroxydé (LOO°), qui arrache un atome d'hydrogène d'une autre molécule lipidique pour former un nouveau (L°) et des hydroperoxydes ($LOOH$). La phase de propagation peut se répéter ainsi plusieurs fois ; on parle alors de réaction en chaîne (Klaunig et al., 2011). En effet, après la réaction d'initiation, les radicaux peroxy et alkoxy issus des acides gras contribuent eux-mêmes à la chaîne de propagation (Jairam et al., 2012).

II.3.1.c La terminaison :

Elle correspond à la phase de formation de molécules plus stables non-radicalaires, obtenue le plus souvent par réaction entre deux radicaux libres ou grâce à l'action d'un antioxydant (Hannebelle et al., 2004).

II.4. La défense cellulaire antioxydante :

II.4.1. Définition d'un antioxydant :

Les organismes aérobies ont développé un système antioxydant efficace, afin de maintenir l'homéostasie redox. Selon Halliwell et Gutteridge, (2000) : un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport au substrat

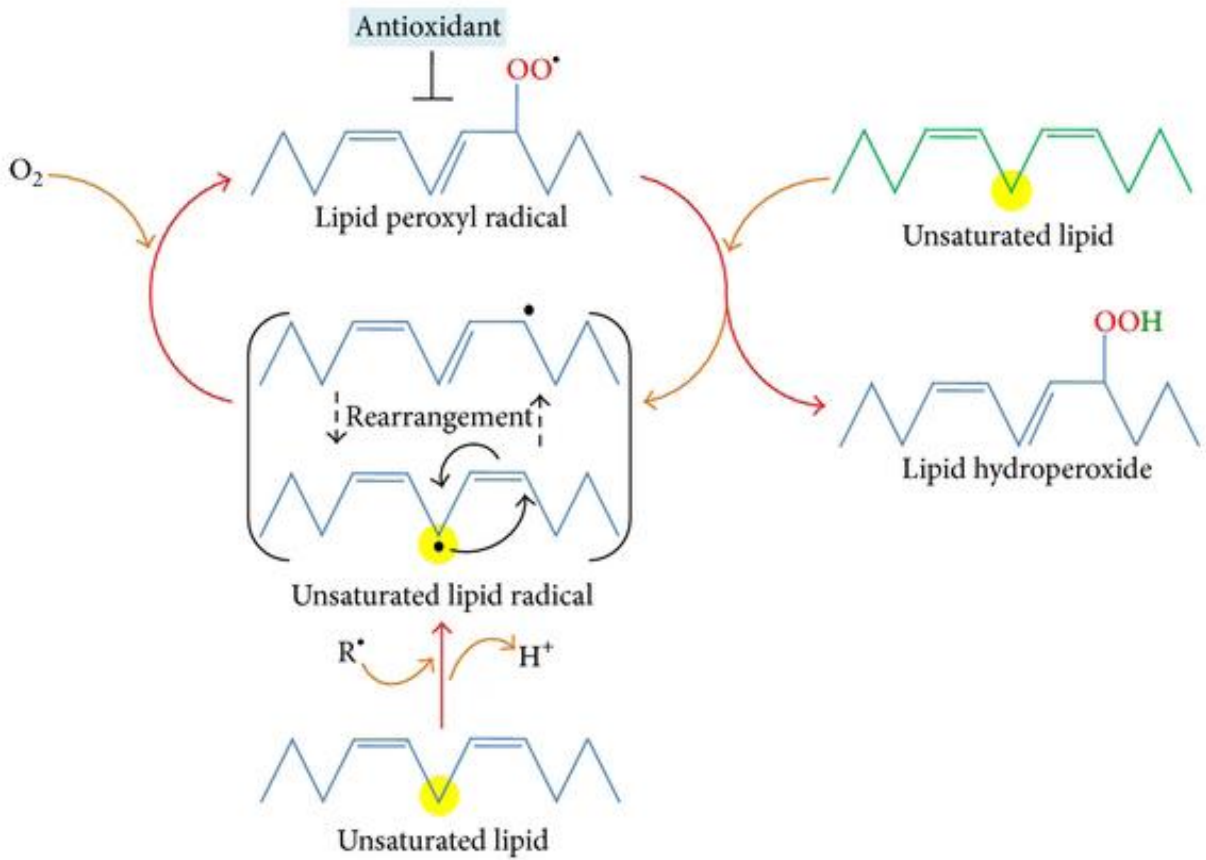


Figure 2 : Processus de la peroxydation lipidique (Ayala et al., 2014)

environnant pouvant être oxydé, retarde ou empêche de façon significative l'oxydation de ce même substrat.

Cette définition, comme la plupart des définitions, semblait imparfaite. C'est pour cela qu'un nouveau concept définit un antioxydant comme « toute substance qui retarde, empêche ou répare les dégâts oxydatifs d'une molécule cible » (**Halliwell et Gutteridge, 2008**).

Les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ROS, ou encore en les piégeant pour former un composé stable. Leur action peut également consister en la séquestration des métaux de transition, ou en la génération du glutathion (GSH), molécule biologique antioxydante d'importance.

D'une manière générale, il existe deux classes d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques. Parmi ces composés, les systèmes de défense enzymatique sont reconnus comme étant les plus performants.

II.4.2. Antioxydants enzymatiques :

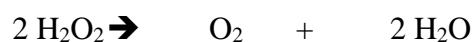
II.4.2.a La superoxyde dismutase (SOD) :

Cette métalloprotéine est classée en trois catégories : la SOD cytosolique (Cu et Zn dépendant), la SOD mitochondriale (Mn-dépendant) et la SOD extracellulaire. C'est l'enzyme antioxydante la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation des radicaux superoxydes en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (**Rengel et al., 2005**).



II.4.2.b La catalase (CAT) :

La CAT est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes érythrocytaires et hépatocytaires. Elle catalyse la détoxification du H_2O_2 produit par la SOD, en le convertissant en oxygène moléculaire et en eau (**Chen et al., 2018**).



II.4.2.c La glutathion peroxydase (GPX) :

Il s'agit d'une enzyme cytoplasmique, sélénium-dépendante, qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réduction des hydroperoxydes, y compris le peroxyde d'hydrogène et les produits de la peroxydation lipidique, en utilisant le glutathion réduit (GSH) (**Zhai et al., 2013**).



La SOD, en conjugaison avec la CAT et la GPX, élimine les radicaux intracellulaires et extracellulaires et inhibe la peroxydation lipidique (**Zhai et al., 2013**).

Matériel
Et
Méthodes

I. Animaux :

Les animaux utilisés dans nos protocoles sont des souris de souche Balb/c obtenues auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Ce sont des souris femelles congéniques, élevées et acclimatées avant toute manipulation dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de Sécurité Alimentaire, Université d'Oran 1. Les animaux vivent dans des cages munies de biberons et d'une mangeoire et sont abreuvés à l'eau et nourris *ad libitum* à l'aide d'un aliment commercial pour rongeurs. Les expériences sont effectuées en respectant le bien-être de l'animal, évitant le stress et l'agitation susceptibles d'interférer avec les résultats.

I.1. Répartition des animaux :

Pour les besoins de notre travail, 18 souris âgées de 5 semaines et pesant en début de manipulation $20 \pm 1,95$ g ont été utilisées. Elles sont réparties en trois lots de six souris chacun :

- **Lot 1** : groupe immunisé à la BLG
- **Lot 2** : groupe immunisé à l'OVA
- **Lot 3** : groupe contrôle

I.2. Protocole d'immunisation :

La sensibilisation est faite par voie intrapéritonéale. Chaque souris reçoit une dose de 100 μ l d'une solution de PBS (1/10), à pH 7,2 contenant 10 μ g de BLG (Negaoui et al., 2009) (Lot 1) ou 5 μ g d'OVA (Park et al., 2017) (Lot2) respectivement mélangés à 2 mg d'adjuvant (Al(OH)₃). Les injections intrapéritonéales ont lieu à J0, puis sous forme de rappels et dans les mêmes conditions au 14^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour pour le premier groupe et au 7^{ème}, 21^{ème} et 28^{ème} jour pour le deuxième groupe.

Dans les mêmes conditions, les souris du groupe contrôle reçoivent une dose de 100 μ l d'une solution de PBS, pH 7,2 mélangés à 2mg d'adjuvant.

I.3. Rôle de l'adjuvant :

L'alum ou hydroxyde d'aluminium (Al(OH)₃) est utilisé comme adjuvant pour sa contribution à la stimulation de la réponse Th2 (Vermout et al., 2003).

I.4. Prélèvement des échantillons sanguins et tissulaires :

Les différents groupes de souris sont sacrifiés à J31 (groupe OVA et contrôle) et à J35 (groupe BLG). Le sang est prélevé, par ponction dans le sinus retro-orbitaire à l'aide d'une pipette pasteur, dans des tubes contenant 0,1% d'EDTA pour l'obtention du plasma. Il est

centrifugé à 2000 x g pendant 15 min à 4°C et le plasma est conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Les organes (foie et intestin) sont soigneusement prélevés, rincés avec une solution fraîche de PBS 1/10, puis aliquotés dans des microtubes Eppendorf que l'on conserve congelés à -20°C.

II. Evaluation de certains paramètres du statut redox :

II.1. Détermination de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

II.1.1. Principe :

La détermination des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) est réalisée par la mesure du malonyldialdéhyde (MDA), principal marqueur de la détermination des radicaux libres et des produits de dégradation des peroxydes lipidiques lors d'un stress oxydatif. Cette méthode est basée sur une réaction, en milieu acide, entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) et la formation d'un pigment absorbant (complexe de condensation chromogénique) à 532 nm, extractible par des solvants organiques comme le butanol.

La réaction colorée obtenue mesure non seulement le MDA préexistant, mais aussi le MDA formé par la décomposition thermique des peroxydes et ceux générés au cours même de la réaction. La concentration en MDA est déterminée à partir d'une gamme étalon de MDA.

II.1.2. TBARS au niveau plasmatique :

Les teneurs des TBARS plasmatiques sont déterminés par la méthode de **Quantanilha et al., (1982)**. 75 µl d'échantillon sont dilués dans 425 µl de NaCl 0,9%, puis à cette solution sont ajoutées 10 µl de buthyl-hydroxy toluène (BHT) (BHT 2% dans l'éthanol) et 500 µl de solution réactionnelle, ensuite le tout est agité. Après incubation à 85°C pendant 30 min et refroidissement dans la glace, les échantillons sont centrifugés à 2000 x g pendant 10 min. La lecture est faite par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda=535$ nm.

II.1.3. TBARS au niveau tissulaire :

Les homogénats tissulaires (foie et intestin) sont séparés à raison de 100 mg de tissu broyé dans 450 µl de tampon. 100 µl d'homogénat déposés dans des tubes Sovirels, puis 100 µl de SDS (8,1%), 750 µl d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 750 µl d'une solution aqueuse de TBA (0,8%) y sont ajoutés. Le volume final du milieu réactionnel est ajusté à 2 ml avec de l'eau distillée. Après agitation, les tubes sont incubés à 95 °C pendant 60 min, puis refroidis dans un bain glacé pendant 5 min afin de stopper la réaction. 500 µl d'eau distillée et 2 ml de

butanol sont additionnés. Les tubes sont vigoureusement agités, centrifugés à 1000 x g pendant 10 min (Ohkawa *et al.*, 1978). La lecture de la phase organique (supérieure) est effectuée à une longueur d'onde $\lambda=532$ nm.

II.2. Le test du pouvoir réducteur (FRAP) :

Le pouvoir réducteur détermine la capacité des antioxydants, présents dans les organes et le plasma, à réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à pH acide. Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur.

Le réactif de FRAP est préparé par mélange de 10 volumes de tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH 3,6), 1 volume de TPTZ (10 mM dans 40 mM d'HCl) et 1 volume de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Dans une cuvette, 1,5 ml de réactif de FRAP, 50 μl de l'échantillon et 150 μl d'eau bidistillée sont mélangés. Après agitation, l'augmentation de l'absorbance est suivie pendant 8 min à 37 °C à 593 nm. Une gamme étalon de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ est utilisée pour déterminer les valeurs de FRAP (Benzie *et Strain*, 1996).

II.3. Détermination des teneurs en protéines totales du foie et de l'intestin :

Les concentrations en protéines totales du jéjunum et du foie sont déterminées par la méthode de Lowry *et al.*, (1951). Le dosage des protéines au niveau hépatique et jéjunal est effectué sur des homogénats préparés dans du tampon phosphate 0,1M à raison de 100 mg de tissu dans 0,9 ml de tampon phosphate.

La sérumalbumine bovine (SAB) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) est utilisée pour établir la courbe de référence. En milieu alcalin, le complexe formé par les ions Cu^{2+} et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines est réduit par le réactif de Folin. Il se développe alors une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines contenues dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde $\lambda=750$ nm.

III. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard ($X \pm \text{ES}$). Les comparaisons des moyennes sont réalisées par l'analyse de variance (ANOVA). Le seuil de signification retenu est celui qui est habituellement considéré, soit 5 %. L'analyse statistique est effectuée à l'aide d'un logiciel GraphPad Prism (version 6).

Résultats

I. Effet de la sensibilisation sur la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) :

L'évaluation de l'effet de l'immunisation à la BLG ou à l'OVA sur la peroxydation lipidique est effectuée par dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) au niveau tissulaire (intestinal, hépatique) et plasmatique.

I.1. Au niveau tissulaire :

Au niveau intestinal, seule la BLG provoque une augmentation significative ($p < 0,05$) de la peroxydation lipidique comparativement aux souris contrôles (**Figure. 3A**). Cependant, nous ne notons aucune différence significative de la concentration en TBARS chez les deux groupes sensibilisés à la BLG et à l'OVA au niveau hépatique (**Figure. 3B**).

I.2. Au niveau plasmatique :

La peroxydation lipidique est considérablement augmentée mais uniquement dans le plasma des souris sensibilisées à l'ovalbumine ($p < 0,001$) (**Figure 4**).

II. Test de pouvoir réducteur (FRAP) :

Comme le montre les figures 5 et 6, la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA n'a pas affecté le pouvoir réducteur tissulaire et plasmatique.

III. Teneur en protéines totales du foie et de l'intestin :

Les résultats sont reportés dans la figure 7. Nous rappelons que le dosage des protéines totales est effectué dans le seul but de déterminer les concentrations de TBARS et de FRAP par quantité de protéines.

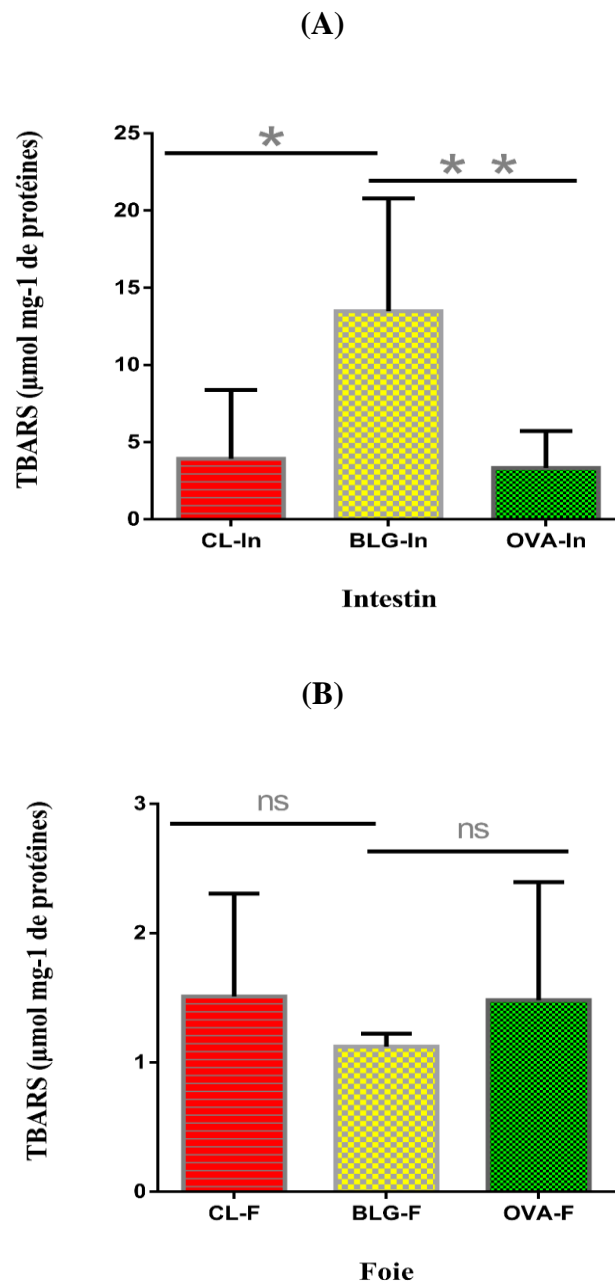


Figure 3 : Teneur en TBARS intestinal (A) et hépatique (B) des souris Balb/c immunisées à la BLG ou à l'OVA (n=6).

CL : Souris contrôles.

BLG : Souris sensibilisées à la BLG.

OVA : Souris sensibilisées à l'OVA.

***p<0,05**

****p<0,01**

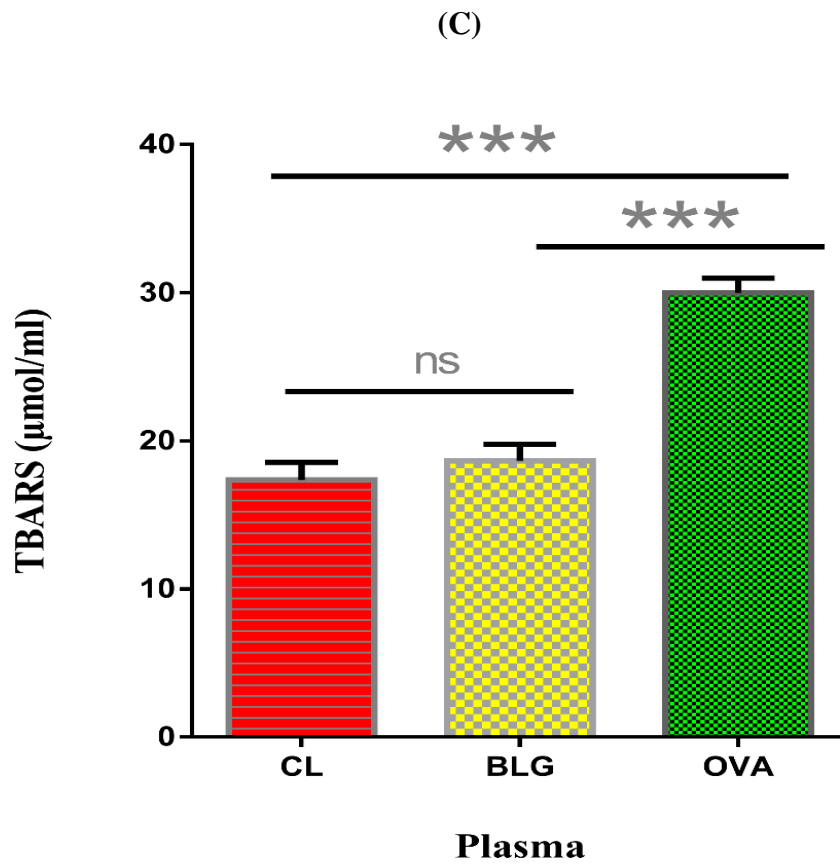


Figure 4 : Teneur en TBARS plasmatique des souris Balb/c immunisées à la BLG ou à l'OVA (n=6).

CL : Souris contrôles.

BLG : Souris sensibilisées à la BLG.

OVA : Souris sensibilisées à l'OVA.

*****p<0,001**

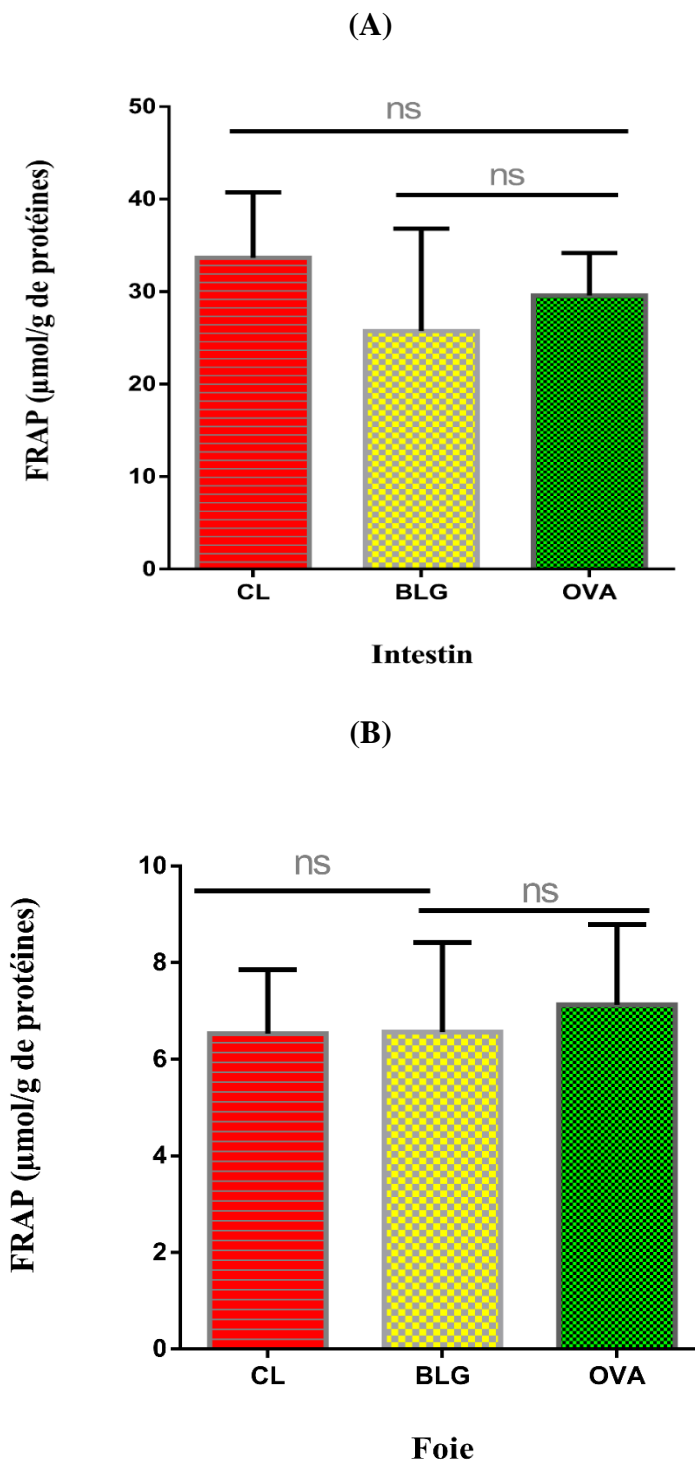


Figure 5 : Effet de la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA sur le pouvoir réducteur hépatique (A) et intestinal (B) des souris Balb/c (n=6).

CL : Souris contrôles.

BLG : Souris sensibilisées à la BLG.

OVA : Souris sensibilisées à l'OVA.

(C)

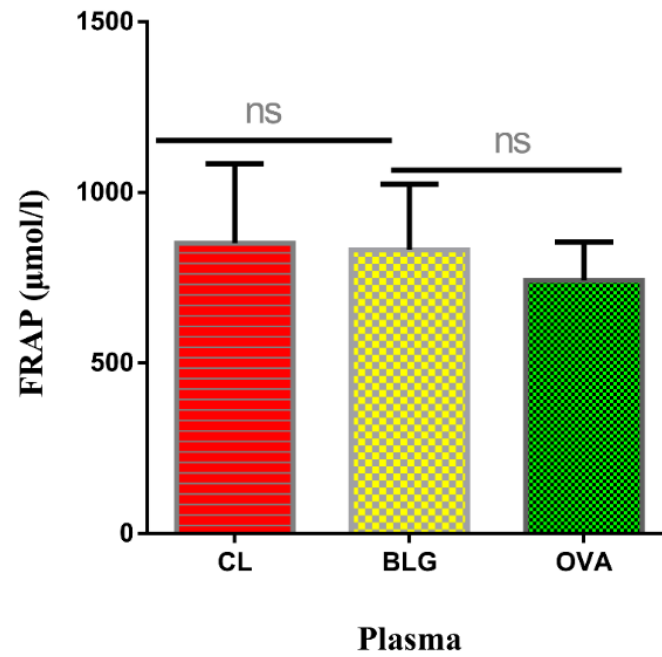


Figure 6 : Effet de la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA sur le pouvoir réducteur plasmatique des souris Balb/c (n=6).

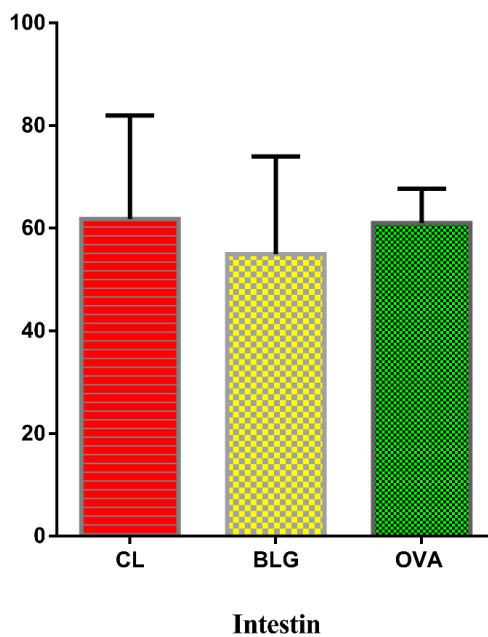
CL : Souris contrôles.

BLG : Souris sensibilisées à la BLG.

OVA : Souris sensibilisées à l'OVA.

(A)

Concentrations en protéines (mg/ml)



(B)

Concentrations en protéines (mg/ml)

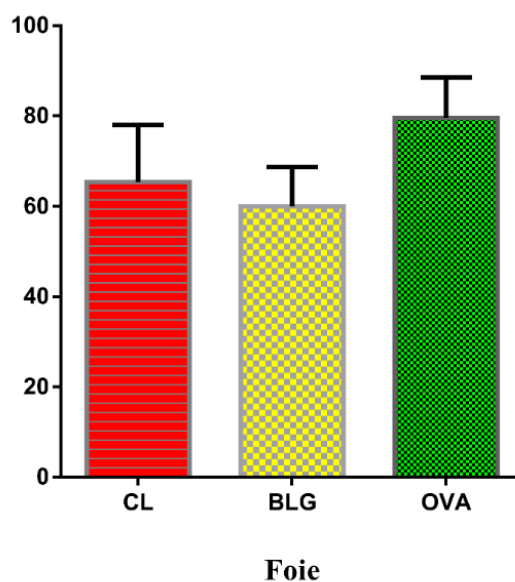


Figure 7 : Teneur en protéines totales au niveau intestinal (A) et hépatique (B) des différents groupes de souris (n=6).

CL : Souris contrôles.

BLG : Souris sensibilisées à la BLG.

OVA : Souris sensibilisées à l'OVA.

Discussion

Le stress oxydatif a été largement impliqué dans diverses pathologies humaines, mais son rôle dans les réponses allergiques applicables aux maladies atopiques demeure non éclairé. Malgré cela, son association avec la sensibilisation allergique est évoquée par plusieurs chercheurs.

Ce travail se focalise principalement sur l'implication du stress oxydatif dans les allergies aux protéines du lait de vache (APLV) et aux protéines de l'œuf suite des sensibilisations à la bêta-lactoglobuline (BLG) et à l'ovalbumine (OVA).

La première partie se consacre à l'évaluation de l'effet de la sensibilisation sur la peroxydation lipidique au niveau tissulaire et plasmatique, et la seconde partie s'intéresse à l'effet de la sensibilisation sur le pouvoir réducteur.

Pour cela, nous avons choisi comme modèle animal, des souris femelles de souche Balb/c, car son complexe majeur d'histocompatibilité semble être relativement proche de celui de l'homme (**Magna et Vervloét, 1997**). En effet, la souche Balb/c est largement utilisée dans l'étude des allergies alimentaires en raison de sa forte réactivité (**Thomas et al., 2009 ; Zhou et al., 2016**). De nombreux travaux ont montré l'efficacité de ce modèle suite à une sensibilisation par voie intrapéritonéale. Notamment, après avoir comparé les effets des deux voies de sensibilisation (intrapéritonéale et intra-gastrique) sur les anticorps IgG et IgE spécifiques à l'OVA, **Dearman et al., (2002)** ont constaté que seule l'injection intrapéritonéale d'OVA entraînait une production plus élevée d'anticorps IgE. Par conséquent, le modèle de souris Balb/c est considéré comme le plus adapté pour étudier les phénomènes d'allergies.

Dans la première partie de notre travail, nous avons montré l'existence d'un stress oxydatif au niveau intestinal et plasmatique concrétisée par une augmentation du taux de TBARS suite à la sensibilisation à la BLG et à l'OVA respectivement.

Actuellement, de nombreuses études confirment l'existence de composantes radicalaires dans des pathologies allergiques (**Tsukhara et al., 2003 ; Sahiner et al., 2011 ; Utsch et al., 2015 ; Topic et al., 2017**). En effet, Utsch et al., (2015) rapportent que le stress oxydatif induit par les allergènes peut être à l'origine d'une réponse Th2 ainsi qu'une inflammation allergique ; ils ont alors conclu que la sensibilité allergique pourrait être associée à une réponse antioxydante inadéquate.

Il est important de noter que la mesure de la lipoperoxydation doit nécessairement passer par la technique des TBARS, qui est l'un des premiers tests d'étude du stress oxydant (**Gutteridge et Halliwell, 2000**). Ce dosage est réalisé par la mesure du MDA, l'un des principaux marqueurs des radicaux libres et des produits de dégradation des peroxydes lipidiques. Cependant, selon Halliwell et Gutteridge (2000), la détermination des TBARS évalue l'oxydation globale de systèmes lipidiques définis (aliments, microsomes...) mais ne peut pas être utilisée pour comparer les peroxydations dans différents systèmes de compositions différentes en AGPI. Ce manque de spécificité est illustré par le fait que les TBARS sont retrouvés dans les tissus et fluides corporels en quantité élevée chez n'importe quel individu malade et ce, quelle que soit la physiopathologie de la maladie (**Gutteridge et Halliwell, 2000**). On pense alors que la méthode des TBARS, à elle seule, n'est pas fiable pour mesurer le niveau de peroxydation lipidique dans les tissus ou d'autres fluides corporels.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés à l'effet que pourraient avoir la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA sur le pouvoir réducteur tissulaire et plasmatique et ce, par le test de FRAP. Nos résultats montrent que la sensibilisation à la BLG ou à l'OVA n'a pas affectée le pouvoir réducteur des animaux.

À notre connaissance, la présente étude est la première à évaluer l'effet de la sensibilisation à des allergènes alimentaires sur le pouvoir réducteur *in vivo*. Cependant, **Almela et al., (2018)** ont évalué certains paramètres du stress oxydatif chez des chiens atteints de dermatite atopique d'origine alimentaire. Dans cette étude, le FRAP était le seul biomarqueur antioxydant présentant une augmentation significative ($p=0,001$) chez les chiens atopiques par rapport aux chiens contrôles.

Ainsi, il est établi que le test de FRAP semble être incapable de mesurer tous les radicaux produits lors du stress oxydatif (**Larrosa et al.,2011 ; Kim et al.,2014**).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail est réalisé dans le but d'évaluer les paramètres du stress oxydant chez des souris Balb/c rendues allergiques. Pour se faire, l'effet de la sensibilisation à deux allergènes alimentaires (BLG et OVA) sur la peroxydation lipidique a été évalué au niveau tissulaire et plasmatique, dans un premier temps. Dans la seconde partie, nous avons évalué l'effet des mêmes allergènes sur le pouvoir réducteur, dans les mêmes compartiments.

Nos résultats montrent l'existence d'une corrélation positive entre la sensibilisation aux allergènes alimentaires et la présence des dommages liés au stress oxydatif. Cette corrélation est reflétée par des taux de TBARS élevés respectivement dans l'intestin ($p < 0,05$) suite à la sensibilisation à la BLG, et dans le plasma ($p < 0,001$) à la suite de l'immunisation à l'OVA.

La sensibilisation à la BLG ou à l'OVA ne semble pas affecter le pouvoir réducteur des animaux, aucune différence significative n'a alors été constatée.

A partir des résultats trouvés, nous pouvons faire la proposition de l'association du stress oxydatif aux conditions allergiques. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes par lesquels le stress oxydant déclenche une réponse Th2 aux allergènes.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F.**, Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 376–387.
- **Almela RM, Rubio CP, Cerón JJ, Ansón A, Tichy A, Mayer U.** Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2018; 230: 229-e82.
- **Angelova P. R. and Abramov A. Y.**, “Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration,” *FEBS Letters.* 2018; vol. 592, no. 5, pp. 692–702.
- **Ansari K.N.** The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences.* 1997 ; 51, 319-336.
- **Asselin J, Hebert J, Amiot J.** Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J Food Sci* 1989 ; 54 : 1037-1039.
- **Ayala, A., Muñoz, M. F., et Argüelles, S.** Lipid peroxidation : production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- **Bartosz G.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology.* 2003; 9, 5-21.
- **Benhamou AH, Caubet JC, Eigenmann PA, Nowak-Wegrzyn A, Marcos CP, Reche M, et al.** State of the art and new horizons in the diagnosis and management of egg allergy. *Allergy.* 2010 ; 65(3) : 283–289.
- **Benhamou, A. H., Schäppi Tempia M.G., Belli D.C., and Eigenmann P.A.** An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Med Wkly.* 2009; 139: 300-307.
- **Benzie I.F. and Strain J.J.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power » : the FRAP assay. *Anal of Biochemistry.* 1996 ; 15, 239(1) ; 70-6.
- **Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RZ, Sampson HA.** Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d III) compared with ovalbumin (Gal d I) in children with egg allergy and in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 ; 93 :1047–59.
- **Bokkon I.**, “Recognition of functional roles of free radicals,” *Current Neuropharmacology.* 2012; vol. 10, no. 4, p.287,
- **Boutin A, Liaboeuf V, Agabriel C, Cleach I, Vitte J.** Profil de sensibilisation moléculaire aux protéines de lait de vache : évolution de 0 à 60 ans. *RevFr Allergol* 2015 ; 3 : 212–20.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Brash, A.R.** (2015). Lipoxygenases: a chronological perspective on the synthesis of S and R fatty acid hydroperoxides. *Bioactive Lipid Mediators*. Springer, Tokyo.
- **Brown D. M., Donaldson K., Borm P. J. et al.**, “Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004 ; vol. 286, no. 2, pp. L344–L353.
- **Burden G.** In: Stallings VA, Oria MP, eds. *Finding a Path to Safety in Food Allergy*. Washington, D.C. : National Academies Press. 2017.
- **Chen L., HU J.Y. and Wang S.Q.** The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*. (2012); 67 (5), 1013-1024.
- **Chen L., J. Zhang, Y. Zhu, Y. Zhang.,** Interaction of chromium(III) or chromium(VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. *Food Chemistry* 2018 (244), 378–385.
- **Comhair, S.A., Bhatena, P.R., Farver, C., Thunnissen, F.B., Erzurum, S.C.** Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: Evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells *FASEB J*. 2001; 15: 70-78.
- **Cooke SK, Sampson HA.** Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol* 1997 ;159(4) : 2026-32.
- **Dearman RJ., Caddick H., Stone S., Kenna JG., Basketter DA., et al.** Immunogenic properties of rapidly digested food proteins following gavage exposure of mice : a comparison of ovalbumin with a potato acid phosphatase preparation. *Food & Chemical Toxicology*. 2002 ; 40 : 625-633.
- **Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N.** A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2005; 15: 316–328.
- **Diaz-Amigo, C., Popping, B.** Food allergens: A regulatory/labelling overview including the VITAL approach. *Encycl. Food Chem*. 2019 ; 615–621.
- **Eigenmann PA.** Anaphylactic reactions to raw eggs after negative challenges with cooked eggs. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 105 : 587-8.
- **Fiocchi A, Schunemann H.J., Brozek J., et al.** Diagnosis and Rationale for Action Against Cow’s Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 ;126 :1119-1128.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Gutteridge J., Halliwell B.** Free radicals and antioxidants in the year 2000 : a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000 ; 899, (1), 136–147.
- **Halliwell B. and Gutteridge J.M.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. 2008.
- **Halliwell B. and Gutteridge J.M.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, USA, 2015.
- **Halliwell, B., Chirico, S.** Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993 ; 57, 715–725.
- **Han, Y., Kim J. and Ahn K.** Food allergy. *Korean J Pediatr.* 2012; 55, 153-8.
- **Hannebelle T, Sahpaz S, Bailleul F.** Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiels dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 2004 ; 1 : 3-6.
- **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).
- **Iweala, O.I., Burks, A.W.** Food Allergy: Our Evolving Understanding of Its Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2016 ; 16, 37.
- **Jairam V., Uchida K., Narayanaswami V.** Pathophysiology of lipoprotein oxidation. In *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology, édité par Sasa Frank and Gerhard Kostner. 2012; chap. 16.
- **Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega Martell, J. A. Platts-Mills, T. A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., and Williams, H. C.** Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113, 832-6.
- **Jones SM, Burks AW.** Food allergy *N Engl J Med.* 2017; 377: 1168–1176.
- **Kalyanaraman, B.** Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 2013 ; 1, 244–257.
- **Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Bennett, B., Zielonka, J.** Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biol.* 2018 ; 15, 347–362.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Kemp AS.** Egg allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 696-702.
- **Kim, M.J., Kim, J.H., Kwak, H.K.** Antioxidant effects of cranberry powder in lipopolysaccharide treated hypercholesterolemic rats. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2014 ; 19, 75–81.
- **Klaunig J.E., Wang Z., Pu X., Zhou S.** Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011 ; (254) : 86–99.
- **Koletzko S, Niggemann B, Arato A., Dias J.A. et al.** Diagnostic approach and management of cow's milk protein allergy in infants and children: ESPAGHAN GI committee practical guidelines. *JPGN.* 2012 ; 55 : 221-229.
- **Larrosa, M., Azorín-Ortuño, M., Yañez-Gascón, M.J., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F., Espín, J.C.** Lack of effect of oral administration of resveratrol in LPS-induced systemic inflammation. *Eur. J. Nutr.* 2011 ; 50 : 673–680.
- **Leonie S. van Rijt, Lara Utsch, René Lutter and Ronald van Ree.** Oxidative Stress : Promoter of Allergic Sensitization to Protease Allergens. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 ; 18, 1112.
- **Liguori I., Russo G., Curcio F. et al.,** “Oxidative stress, aging, and diseases,” *Clinical Interventions in Aging.* 2018; vol. 13, pp. 757–772.
- **Liu J., Wen X., Zhang X., Pu H., Kan J., Jin Ch.,** Extraction, characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from black soybean. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015 ; (72) :1182–1190.
- **Liu, B., Qu, L., Yan, S.** Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* 2015 ; 15 : 106–112.
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951 ; 193 : 265-75.
- **Magnan A, Vervloet D.** Allergy: determinant of T2 lymphocyte polarization and desensitization mechanisms. *Rev Mal Respir.* 1997 ; 14 : 173-181.
- **Maritim A.C., Sanders R.A., and Watkins J.B.,** “Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review,” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 2003; vol. 17, no. 1, pp. 24-38.
- **Martínez-Cayuela M.** (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77, 147-161.
- **Mazzocchi A., Venter C., Maslin K., Agostoni C.** The role of nutritional aspects in food allergy: prevention and management *Nutrients.* 2017 ; 9 : 850.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Negaoui H, Kaddouri H, Kheroua O et Saidi D.** A Model of Intestinal Anaphylaxis in Whey Sensitized Balb/c Mice. *Am J Immunol.* 2009; 5: 56-60.
- **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxydases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem,* 1978; 85 :351-358.
- **Park HY, Yoon TJ, Kim HH, Han YS, Choi HD.** Changes in the antigenicity and allergenicity of ovalbumin in chicken egg white by N-acetylglucosaminidase. *Food Chemistry.* 2017; 217: 342–345.
- **Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A.** Oxidative stress in Alzheimer’s disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014; 427318.
- **Pisoschi, A.M., Pop, A.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 97, 55–74.
- **Prescott SL., Ruby P., Allen KJ, Campbell DE, Sinn John KH, et al.** A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ J.* 2013 ; 6 : 1-12.
- **Quantanilha AT, Parker L, Szyszło DJA, Racnelly TL, Davies KJA.** Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density of skeletal muscle and liver mitochondrial. *Ann NY Acad Sci.* 1982 ; 393 : 32-47.
- **Radi R., Denicola A., Morgan B., and Zielonka J.,** “Foreword to the free radical biology and medicine special issue on current fluorescence and chemiluminescence approaches in free radical and redox biology,” *Free Radical Biology & Medicine,* vol. 128, pp. 1-2, 2018.
- **Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H.** Prevalence and main characteristics of school children diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy.* 2005 ; 35(2) :167–72.
- **Reddy IM, Kella NKD, Kinsella JE.** Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J Agric Food Chem.* 1988; 36: 737- 741.
- **Rengel R.G., Filipović-Grcić J., Cepelak, I., Zanić-Grubisić, T., Barisić, K.** The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005 ; (60) 47–51.
- **Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci O.** Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organ J.* 2011 ; 4(10) :151–8.
- **Savage J, Johns CB.** Food allergy *Immunol Allergy Clin N AM.* 2015; 35: 45–59

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Sawyer L, and Kontopidis G.** The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica Biophysica Acta*. 2000 ; 1482 : 136-148.
- **Schmidt DG, Meijer RJGM, Slangen CJ, van Beresteijn ECH.** Raising the pH of the pepsin catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clin Exp Allergy* 1995 ; 25 : 1007-1017.
- **Sen, T., Sen, N., Tripathi, G., Chatterjee, U., Chakrabarti, S.** Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. *Neurochem. Int.* 2006; 49, 20–27.
- **Sicherer SH, Sampson HA.** Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 ; 120 (3) : 491–503.
- **Sies H., Berndt C., and Jones D. P.** “Oxidative stress,” *Annual Review of Biochemistry*. 2017; vol. 86, pp. 715–748,
- **Sies, H.** Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015, 4, 180–183.
- **Tangvarasittichai S.** “Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus,” *World Journal of Diabetes*, vol. 6, no. 3, pp. 456–480, 2015.
- **Thijs C, Müller A, Rist L, et al.** Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitization in infancy *Allergy*. 2011 ; 66 :58–67.
- **Thomas K, Macintosh S, Bannon G, Herouetguicheney C, Holsapple M, et al.** Scientific advancement of novel protein allergenicity evaluation: an overview of work from the HESI Protein Allergenicity Technical Committee (2000-2008). *Food & Chemical Toxicology*. 2009; 47: 1041-1050.
- **Topic A, Francuski D, Nikolic A, Milosevic K, Jovicic S, Markovic B, et al.** The role of oxidative stress in the clinical manifestations of childhood asthma. *Fetal Pediatr Pathol.* 2017 ; 36 : 294-303.
- **Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, et al.** Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci.* 2003 ; 72 :2509-16.
- **Turnbull JL, Adams HN, Gorard DA.** Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2015; 41: 3-25.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Utsch L, Folisi C, Akkerdaas JH, Logiantara A, Van de Pol MA, van der Zee JS, Krop EJ, Lutter R, van Ree R, van Rijt LS.** Allergic sensitization is associated with inadequate antioxidant responses in mice and men. *Allergy*, 2015 ; 70 : 1246-1258.
- **Vandenplas Y, De Greef E, Devreker T.** Treatment of cow's milk protein allergy. *Pediatr GastroenterolHepatol Nutr.* 2014 ; 17 :1-5.
- **Vermout S, Denis M, Losson B, Mignon B.** Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann Med Vet.* 2003 ; 147 : 393-401.
- **Wal JM.** Allergénicité des protéines laitières. *Innovations Agronomiques.* 2011 ; 13 : 25-43.
- **Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.M., Tieleman, D.P., Monticelli, L.** Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 2007 ; 93 : 4225–4236.
- **Wu S.B., Wu Y.T, Ma Y.S, Yau-Huei Wei Y.H.** Oxidative stress and its biochemical consequences in mitochondrial DNA mutation-associated diseases : implications of redox therapy for mitochondrial diseases. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling.* 2011 ; pp. 33-49.
- **Yu, W., Freeland, D.M.H. Nadeau, K.C.** Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2016 ; 16 : 751–765.
- **Zhai, X.W., Zhang, Y.L., Qi, Q., Bai, Y., X-L. L-J. Chen Jin, X-G. Ma, R-Z. Shu, Z-J. Yang, F-J. Liu.** Effects of molybdenum on sperm quality and testis oxidative stress, *Syst. Biol. Reprod. Med.* (2013) ; 59(5) 251-255.
- **Zhang, L., Wang, X.; Cueto, R.; Effi, C.; Zhang, Y.; Tan, H.; Qin, X.; Ji, Y.; Yang, X.; Wang, H.** Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 2019 ; 26, 101284.
- **Zhou C, Ludmilla T, Sun N, Wang C, Pu Q, et al.** BALB/c mice can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts. *Food & Agricultural Immunology.* 2016; 27: 589-603.