





**Comparaison de la diversité microbienne intestinale chez des enfants ayant des allergies alimentaires avant et après un traitement d'immunothérapie orale.**

**Par Thanina Bouabid**

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences cliniques et biomédicales**

Québec, Canada

## RÉSUMÉ

L'allergie alimentaire touche 8 % des Canadiens et provoque des symptômes variables allant d'une urticaire à un choc anaphylactique. Celle-ci peut être traitée par immunothérapie orale (ITO), une approche qui consiste à ingérer de petites doses de l'allergène et à les augmenter progressivement jusqu'à développer une désensibilisation.

Les micro-organismes du tractus gastro-intestinal, ou microbiote intestinal, joue un rôle clé dans le risque de développer des allergies alimentaires. La diversité microbienne varie entre les enfants avec et sans allergies et est également influencée par des facteurs environnementaux. À ce jour, les effets de l'immunothérapie orale sur le microbiote intestinal ont été peu étudiés. L'objectif de cette étude est donc de comparer la composition et la diversité microbienne intestinale chez les enfants allergiques avant et après un traitement d'immunothérapie orale.

L'étude inclut 30 enfants suivis à la clinique de recherche Zéro allergie du Saguenay-Lac-St-Jean ayant suivi une ITO. Des échantillons de selles ont été prélevés avant et après l'immunothérapie orale. L'ADN microbien a été extrait, puis le gène codant pour l'ARNr 16S a été séquencé. Les données ont été analysées pour comparer la diversité alpha et la diversité bêta, ainsi que l'abondance des bactéries présentes.

L'analyse différentielle a révélé deux phyla bactériens, Bacteroidota et Verrucomicrobiota dont les niveaux d'abondance après l'immunothérapie orale se rapprochaient de ceux des enfants non allergiques. Cela suggère que l'immunothérapie orale a un effet modulateur sur la composition microbienne intestinale, favorisant, dans la présente étude, une normalisation des niveaux de ces phyla. Ces résultats apportent des perspectives pour le développement de nouvelles thérapies, par exemple par l'utilisation de probiotiques pour améliorer la prise en charge des allergies alimentaires.

En conclusion, cette étude est la première à démontrer l'impact de l'immunothérapie orale sur le microbiote intestinal chez les enfants présentant des allergies alimentaires, ouvrant la voie à de nouvelles thérapies.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	x
REMERCIEMENTS .....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 .....	6
1.1 Définition de l'allergie alimentaire .....	6
1.2 Épidémiologie de l'allergie alimentaire .....	7
1.3 Facteurs de risque de l'allergie alimentaire.....	8
1.4 Physiopathologie de l'allergie alimentaire .....	10
Phase de sensibilisation .....	10
Phase de déclenchement.....	11
1.5 Symptomatologie de l'allergie alimentaire.....	12
1.6 Diagnostic de l'allergie alimentaire .....	13
1.7 Traitement de l'allergie alimentaire .....	15
Efficacité de l'immunothérapie orale dans les allergies alimentaires .....	17
Types d'immunothérapie.....	17
1.7.1.1 L'immunothérapie sublinguale.....	17
1.7.1.2 L'immunothérapie épicutanée .....	18
1.7.1.3 L'immunothérapie orale (ITO) .....	18
CHAPITRE 2 – Le microbiote intestinal.....	20
2.1 Composition du microbiote intestinal .....	20
2.2 Rôle du microbiote intestinal .....	21
2.3 Facteurs influençant le microbiote intestinal .....	23
L'âge.....	24
L'alimentation .....	24
La grossesse, le microbiote maternel, le mode d'accouchement et l'allaitement .....	25
L'utilisation des antibiotiques.....	26
Facteurs environnementaux et génétiques .....	27

CHAPITRE 3 – Rôle du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires .....	28
3.1 Le mécanisme du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires.....	28
3.2 Diversité microbienne intestinale chez l'enfant .....	30
3.3 Modulation du microbiote intestinal : perspectives et implications cliniques .....	33
Régimes alimentaires.....	34
Probiotiques.....	34
Prébiotiques.....	35
Symbiotiques .....	35
Postbiotiques .....	36
Transplantation de microbiote fécal.....	36
3.4 Synthèse des études antérieures sur le rôle de l'immunothérapie orale dans la modulation du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires.....	37
CHAPITRE 4 – Impact of oral immunotherapy on diversity of gut microbiota in food-allergic children .....	42
4.1 Avant-propos .....	42
4.2 Résumé .....	43
4.3 Abstract .....	45
4.4 Introduction .....	47
4.5 Methods.....	49
4.5.1 Study population.....	49
4.5.2 Oral immunotherapy (OIT).....	50
4.5.3 Gut microbiota .....	51
4.5.4 DNA extraction and sequencing.....	51
4.5.5 Statistical analyses .....	52
4.6 Results .....	55
4.6.1 Participant characteristics.....	55
4.6.2 Oral immunotherapy (OIT).....	56
4.6.3 Alpha diversity .....	56
4.6.4 Beta diversity between allergic children before and after OIT .....	57
4.6.5 Beta diversity in controls and allergic children before OIT .....	59
4.6.6 Differential abundances.....	59
4.7 Discussion .....	61
4.8 Acknowledgements .....	64
4.9 References .....	65
DISCUSSION .....	69
CONCLUSION.....	76
BIBLIOGRAPHIE .....	77

CERTIFICATION ÉTHIQUE .....	85
ANNEXE 1 .....	86
Supplementary Tables .....	86
Supplementary Figures .....	88

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Définitions des indices richesse (Richness), d'équitabilité (Evenness), indices Chao1 et Shannon utilisés pour l'analyse de la diversité $\alpha$ .....	4
<b>Tableau 2.</b> Symptômes de l'allergie alimentaire selon l'organe ciblé. ....	12
<b>Tableau 3.</b> Résultats des différences de la diversité microbienne intestinale rapportés dans les études de cohortes cas-témoins sur l'allergie alimentaire (AA).....	32
<b>Table 4.</b> Baseline characteristics of the children. ....	50
<b>Table 5.</b> Table summarizing results of the differential abundance analysis of the bacterial phyla identified. ....	86
<b>Table 6.</b> Table summarizing significant results of the differential abundance analysis (FDR < 0.05) comparing controls to food allergic children before oral immunotherapy.....	87

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Classification des différentes pathologies causées par les allergies alimentaires selon les trois réponses immunitaires. Figure adaptée de Satitsuksanoa, P et <i>al.</i> . <sup>25</sup> (Fait à l'aide de BioRender <sup>®</sup> ).....	6
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique des deux phases de la physiopathologie de l'allergie alimentaire. (Fait à l'aide de Biorender <sup>®</sup> ).....	11
<b>Figure 3.</b> Processus de l'immunothérapie orale. (Fait à l'aide de Biorender <sup>®</sup> ).....	19
<b>Figure 4.</b> Mécanismes d'action du microbiote intestinal sur la réponse immunitaire et la sensibilité aux allergènes alimentaires. Le microbiote module l'immunité de type 2, régule l'activité des basophiles, influence la maturation immunitaire (via les cellules dendritiques, les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes innés), et favorise l'intégrité de la barrière intestinale par la production d'IgA et l'induction de cytokines comme l'IL-22. (Fait à l'aide de Biorender <sup>®</sup> ) .....	30
<b>Figure 5.</b> Schematic of the study design. The analysis steps include comparisons of alpha and beta diversities and identification of intestinal microbial taxa with differential abundance <b>(1)</b> between children with FA before (T0 FA) and after (T1 FA) the up dosing phase of oral immunotherapy and <b>(2)</b> between controls and the T0 FA group. Finally, <b>(3)</b> comparisons were made between differently abundant taxa identified in the two previous comparisons for assessing if OIT induces a reversion of certain taxa to normal abundance levels. The figure is generated using BioRender.com. ....	53
<b>Figure 6.</b> Description of FA profile among allergic children. <b>(A)</b> The frequency related to the number of food allergens leading to allergic reaction for each child. <b>(B)</b> Types of food allergens in allergic children. <b>(C)</b> Food allergens targeted by desensitization in allergic children. (Nuts - cashews, hazelnuts, and pistachios; legumes - lentils, peanuts, and peas; Animal products - egg, milk). The figure is generated using BioRender.com.....	55
<b>Figure 7.</b> Alpha diversity between controls (C, green) and children with FA before oral immunotherapy (T0 FA, orange) measured by <b>(A)</b> observed index, <b>(B)</b> Chao1 index, <b>(C)</b> evenness index, and <b>(D)</b> Shannon index. Boxes represent quartiles, illustrating the largest distribution of both sample groups, with the line showing the median. The <i>p</i> -values were calculated using ANOVA ( <i>p</i> < 0.05). Three out of four alpha diversity metrics showed significant differences, while evenness (C) was non-significant (N.S.), as indicated in the figure. ....	57
<b>Figure 8.</b> Plots showing Bray–Curtis dissimilarity in (PCoA) space for samples of <b>(A)</b> children with FA before and after the up dosing phase of OIT and <b>(B)</b> children with FA before OIT and controls. Three different shades of orange, from lightest to darkest, represent children with FA before OIT (T0 FA): light orange for those who reached complete desensitization (CoD), medium orange for clinical desensitization (CID), and dark orange to represent children who achieved clinical desensitization for one allergen and complete desensitization for the other (CID_CoD). Three different shades of blue, from lightest to darkest, represent children with	



FA after OIT (T1 FA) with the same clinical categories. Green circles represent controls (C). Triangles of the same colors represent their replicates. Gray connecting lines link paired T0-T1 samples from the same subject in panel A and connect samples to their technical replicates in both panels. ....58

**Figure 9.** Phyla with significant differences in abundance levels. **(A)** Barplots showing significant log (fold changes) (LFC; y-axis) by bacterial phyla (x-axis) generated using ANCOM-BC test with significance threshold set to false discovery rate (FDR) < 0.05 for the comparison between allergic children before (T0 FA) and after (T1 FA) the up dosing phase of the OIT groups. Orange bars represent the bacterial phyla more abundant in the T0 FA group than in the T1 FA group (negative LFC values). **(B)** Significant LFCs of bacterial phyla between the control and T0 FA groups. Orange bars represent bacterial phyla more abundant in the T0 FA group than in the control group (positive LFC values). **(C)** Abundance of the phylum Bacteroidota across the three groups: controls (C), T0 FA, and T1 FA. **(D)** Abundance of the phylum Verrucomicrobiota across the three groups: C, T0 FA, and T1 FA. The p-values for **C** and **D** were derived from ANCOM-BC analyses with Bonferroni correction for significance threshold ( $\alpha = 0.0167$  for 3 comparisons). ....60

**Figure 10.** Alpha diversity between food allergic children before (T0 FA, orange) and after (T1 FA, blue) oral immunotherapy measured by **A:** observed index, **B:** Chao1 index, **C:** evenness index, and **D:** Shannon index. Boxes represent the quartiles, illustrating the largest distribution of both sample groups, with the line showing the median. No significant differences were found in alpha diversity indices. ....88

**Figure 11.** Variance homogeneity of microbial diversity presented using principal coordinates analyses (PCoA) calculated from Bray Curtis dissimilarity. **A:** Replicates of the samples of the food allergic children before (T0 FA) and after (T1 FA) oral immunotherapy. **B:** Samples of T0 FA and T1 FA groups. **C:** Replicates of the samples of the controls and T0 FA groups. **D:** Samples of the controls and T0 FA groups. ....89

**Figure 12.** Boxplots showing the distance to centroid. **A:** Replicates of the samples of T0 FA and T1 FA groups. **B:** Samples of the T0 FA and T1 FA groups. **C:** Replicates of the samples of controls and T0 FA groups. **D:** Samples of the controls and T0 FA groups. ....90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**16S rRNA** : ARN ribosomal 16S  
**AA** : Allergie alimentaire  
**Ag** : Antigène  
**AGCC** : Acides gras à chaîne courte  
**AHR** : Récepteur aryl-hydrocarbure (Aryl Hydrocarbon Receptor)  
**ANCOMBC** : Analysis of Composition of Microbiomes with Bias Correction  
**ANOVA** : Analyse de la variance (Analysis of Variance)  
**CFU** : Unités formant colonies (Colony Forming Units)  
**CIUSSS** : Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux  
**DNA** : Acide désoxyribonucléique  
**DA** : Dermatite atopique  
**FA** : Food Allergy (Allergie alimentaire)  
**FDR** : False Discovery Rate (Taux de fausse découverte)  
**Foxp3** : Facteur de transcription FoxP3  
**IgE** : Immunoglobulines E  
**IL** : Interleukine  
**ITO** : Immunothérapie orale  
**MI** : Microbiote intestinal  
**M:F** : Ratio masculin:féminin  
**OIT** : Immunothérapie orale (Oral Immunotherapy)  
**OTU** : Unités taxonomiques opérationnelles (Operational Taxonomic Units)  
**OVA** : Ovalbumine  
**PCoA** : Analyse en coordonnées principales (Principal Coordinates Analysis)  
**PERMANOVA** : Analyse de variance multivariée par permutations  
**RLE** : Relative Log Expression  
**SPT** : Skin Prick Test (Test cutané)  
**SU** : Tolérance soutenue (*Sustained Unresponsiveness*)  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor Beta  
**Treg** : Cellules T régulatrices  
**ZAC** : *Zéro allergie cohort*

## REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers ma directrice de recherche, la Pre Catherine Laprise, qui a été pour moi un modèle exemplaire de professionnalisme et d'engagement scientifique. Son humanité, sa compréhension et son expertise ont créé un environnement propice à l'exploration, à l'apprentissage et à l'accomplissement. Sa bienveillance et son soutien indéfectible ont été essentiels pour m'accompagner dans les défis inhérents à mon parcours. Grâce à elle, j'ai pu m'intégrer dans cette aventure scientifique avec confiance et sérénité, et je suis profondément reconnaissante pour son encadrement inestimable.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers Anne-Marie Madore, son expertise, sa disponibilité et sa bienveillance ont été d'une aide précieuse tout au long de ce projet. Son sourire et ses encouragements constants ont créé une atmosphère positive et motivante, contribuant ainsi de manière significative à la réussite de ce mémoire.

Je remercie également chaleureusement tous les membres de l'équipe de la Pre Catherine Laprise, qui sont devenus bien plus que de simples collègues. Leur engagement, leur soutien et leur amitié ont contribué à cultiver un environnement de travail des plus agréables, où entraide et convivialité sont les maîtres-mots. Grâce à eux, ce parcours a été non seulement une expérience professionnelle enrichissante, mais aussi une aventure humaine inoubliable, et je leur en suis infiniment reconnaissante.

Enfin, mes pensées se tournent vers ma famille et mes amis, qui ont été pour moi une source de soutien inconditionnel et de motivation tout au long de cette aventure. Leur foi en moi, leurs encouragements et leur amour m'ont apporté la force nécessaire pour persévérer et mener ce projet à terme. Sans eux, ce mémoire n'aurait pas vu le jour, et je leur exprime ma gratitude la plus sincère.

## INTRODUCTION

L'allergie alimentaire (AA) est une réaction excessive de l'organisme à un antigène d'origine alimentaire, habituellement inoffensif pour la population sans allergie. <sup>1</sup>

Actuellement, les AA présentent un problème de santé publique qui affecte autant les enfants que les adultes, la prévalence ne fait qu'augmenter durant ces 2-3 dernières décennies. <sup>2</sup> Environ 8% des enfants en souffrent, 2,4% ont plusieurs AA et 3% ont été victime d'un choc anaphylactique. <sup>3</sup> On recense plus de 160 aliments pouvant causer des AA avec des prévalences variables en fonction de la population étudiée et des aliments. <sup>4</sup> Approximativement 90% des réactions allergiques liées à des aliments sont causés par : le lait de vache, les œufs, le soya, les arachides, les noix (principalement les noix de cajou), le blé, le poisson et les crustacés. <sup>3</sup>

L'augmentation de la prévalence des AA est due à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. <sup>5</sup> Ces facteurs de risque sont divisés en deux catégories, la première étant les facteurs non modifiables qui incluent la prédisposition génétique, l'âge et l'eczéma du nourrisson, puis les facteurs modifiables qui comportent l'introduction des allergènes, l'allaitement maternel, l'exposition aux micro-organismes et l'altération du microbiote intestinal. <sup>5</sup> De ces facteurs, l'eczéma, est celui qui est le plus incriminé, en particulier l'eczéma à un âge précoce. <sup>6</sup>

La symptomatologie de la maladie est variable d'une personne à l'autre, mais également dans le parcours de vie d'un individu. Elle peut se manifester sous forme d'un prurit, d'une urticaire allant jusqu'à de sévères manifestations touchant plus d'un organe causant un choc anaphylactique

connu comme une réaction allergique aiguë et grave qui pourrait être fatale pour la vie de l'enfant et causer son décès.<sup>3</sup>

À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif pour l'AA, le principal élément dans la prise en charge est l'éviction de l'allergène causant l'AA. L'éviction entraîne des restrictions alimentaires ce qui peuvent conduire à une insécurité alimentaire.<sup>7</sup> Cela altère la qualité de vie de la personne atteinte ainsi que sa famille et provoque des réactions graves lors d'ingestion accidentelle chez plus d'un tiers des enfants allergiques.<sup>7</sup>

Une multitude d'études sont en cours pour élaborer de nouvelles thérapies pour la prise en charge des AA. L'immunothérapie orale (ITO) ou la désensibilisation est l'une des stratégies dans la prise en charge des AA en cours d'essai, cela consiste à administrer des petites doses de l'allergène provoquant l'hypersensibilité de façon progressive jusqu'à atteindre une portion dite tolérable (qui ne cause pas de réaction allergique importante), et ce, sous contrôle médical.<sup>8</sup> De nombreux protocoles sont en cours d'essai et varient selon l'allergène responsable de la maladie. Environ 80% des patients subissant l'immunothérapie orale répondent bien et arrivent à une désensibilisation, dont 30 à 50 % atteignent la tolérance soutenue (TS; qui est la traduction de *Sustained Unresponsiveness*).<sup>9</sup>

L'immunothérapie, en modulant la réponse immunitaire spécifique aux allergènes alimentaires, peut induire des changements significatifs dans le microbiote intestinal, suggérant un rôle interactif et potentiellement thérapeutique (préventif ou curatif) du microbiome dans le traitement des AA.<sup>8</sup>

Le microbiote intestinal (MI), ensemble de micro-organismes composé principalement de bactéries qui se retrouvent au niveau du tractus gastro-intestinal, joue un rôle dans le soutien de la santé humaine. <sup>10</sup>

Le MI est principalement composé de quatre phylas microbiens, soient : Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes et Bacteroides. Ces 4 groupes représentent 98% du microbiote intestinal.

<sup>11</sup> La composition du MI change en fonction de l'âge, le microbiote du nouveau-né est dominé par des Protéobactéries (*Escherichia*, *Shigella*) et des Actinobacteria (*Bifidobacterium*) en revanche, le microbiote adulte est dominé par les Firmicutes et les Bacteroides. <sup>11</sup> Plus précisément, à la suite de la découverte de l'ADN bactérien dans le placenta, le liquide amniotique et le méconium du nouveau-né, il est documenté que ce microbiote se forme durant la vie intra-utérine. <sup>12</sup> Quant à sa composition, elle serait modifiée dans les trois premières années de la vie pour se maintenir ensuite jusqu'à l'âge adulte. <sup>12</sup>

La dysbiose, qui correspond à un déséquilibre du microbiote intestinal, peut être causée par plusieurs facteurs, comme la transmission du microbiote vaginal et intestinal de la mère au nouveau-né. Ainsi, le mode d'accouchement, l'âge gestationnel, le type d'alimentation, l'utilisation d'antibiotiques, avoir une fratrie ou un animal de compagnie et les différences régionales incluant l'alimentation et les conditions sanitaires sont tous des facteurs documentés pour moduler la composition du MI. <sup>12</sup> Des études ont montré qu'un MI sain protège contre les AA, en outre, la dysbiose de ce dernier affecte la tolérance orale et confère une susceptibilité à l'AA. <sup>5</sup>

La diversité microbienne intestinale peut être évaluée à l'aide de deux indicateurs complémentaires : la diversité alpha ( $\alpha$ ), qui mesure la richesse et l'homogénéité des espèces au

sein d'un même échantillon, et la diversité bêta ( $\beta$ ), qui compare les différences de composition entre plusieurs échantillons. Plusieurs indices sont couramment utilisés pour évaluer la diversité  $\alpha$ , notamment la richesse (richness), l'équitabilité (evenness), ainsi que les indices Chao1 et Shannon. Le tableau 1 suivant présente une brève description de ces indices ainsi que leurs limites et avantages dans le contexte du microbiote intestinal.

**Tableau 1.** Définitions des indices richesse (Richness), d'équitabilité (Evenness), indices Chao1 et Shannon utilisés pour l'analyse de la diversité  $\alpha$ .

Indice	Définition	Avantages	Limites	Références
Richesse observée ( <i>Richness</i> )	Nombre total d'espèces (ou unités taxonomiques) détectées dans un échantillon, mesure la quantité d'espèces identifiées	Simple à calculer ; indicateur direct de la diversité	Ne tient pas compte de l'abondance relative ni des espèces rares non détectées	Magurran et al., Lozupone et al. <sup>13,14</sup>
Équitabilité ( <i>Evenness</i> )	Distribution uniforme des abondances entre les espèces présentes, mesure le niveau d'équilibre entre les espèces	Fournit une idée de la dominance ou rareté des espèces	Sensible aux biais d'échantillonnage ; difficile à interpréter seul	Magurran et al., Jost et al. <sup>13,15</sup>
Chao1	Estimateur de la richesse totale, incluant les espèces rares non détectées, mesure la richesse réelle estimée, corrigée des espèces rares	Corrige le sous-échantillonnage ; sensible aux espèces peu fréquentes	Dépend de la qualité des données (espèces singletons/doublons)	Chao Anne <sup>16</sup>
Shannon	Mesure combinée de richesse et d'équitabilité ; basé sur l'entropie, prenant en compte à la fois nombre et abondance des espèces	Intègre à la fois richesse et répartition	Moins sensible aux espèces rares que Chao1	Gaggiotti et al., Chao et al. <sup>17,18</sup>

Une étude menée auprès de 233 enfants atteints d'AA et 58 témoins non allergiques a révélé des différences significatives de ces deux types de diversité dans leur MI. <sup>19</sup> En effet, ils ont noté une augmentation de *Clostridium sensu stricto* et d'*Anaerobacter* chez les enfants atteints

d'AA, tandis que *Bacteroides* et *Clostridium XVIII* étaient diminués chez les témoins.<sup>20</sup> De plus, l'analyse du microbiote des enfants ayant une allergie au lait résolue à l'âge de 8 ans présentait une diversité microbienne qui était différente par rapport aux nourrissons souffrant d'allergies persistantes.<sup>21</sup> À notre connaissance, seulement deux études ont exploré l'impact de l'immunothérapie orale (ITO) sur le microbiome intestinal. La première a porté sur sept adultes atteints d'allergie à l'arachide, tandis que la seconde s'est intéressée à 32 enfants d'âge scolaire présentant une allergie au lait de vache, en analysant les interactions entre taxons microbiens et métabolites fécaux regroupés en groupes, afin d'identifier les facteurs associés à l'acquisition d'une tolérance soutenue.<sup>22,23</sup>

À partir des études antérieures, cette étude a pour objectif principal de comparer la diversité microbienne chez des enfants ayant des AA avant et après une ITO. De plus, puisque 20% des enfants n'obtiennent pas de résultat satisfaisant, c.-à-d., qu'ils n'atteignent pas une dose dite de tolérance ou une tolérance soutenue, cette étude pourrait permettre d'identifier une diversité microbienne distincte des enfants qui atteignent cette tolérance soutenue. Ultimement, les résultats devraient permettre de mieux comprendre les impacts de ce traitement pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques plus accessibles en plus de mieux orienter la sélection des enfants admissibles pour ce traitement (médecine personnalisée; ou le bon traitement pour la bonne personne).



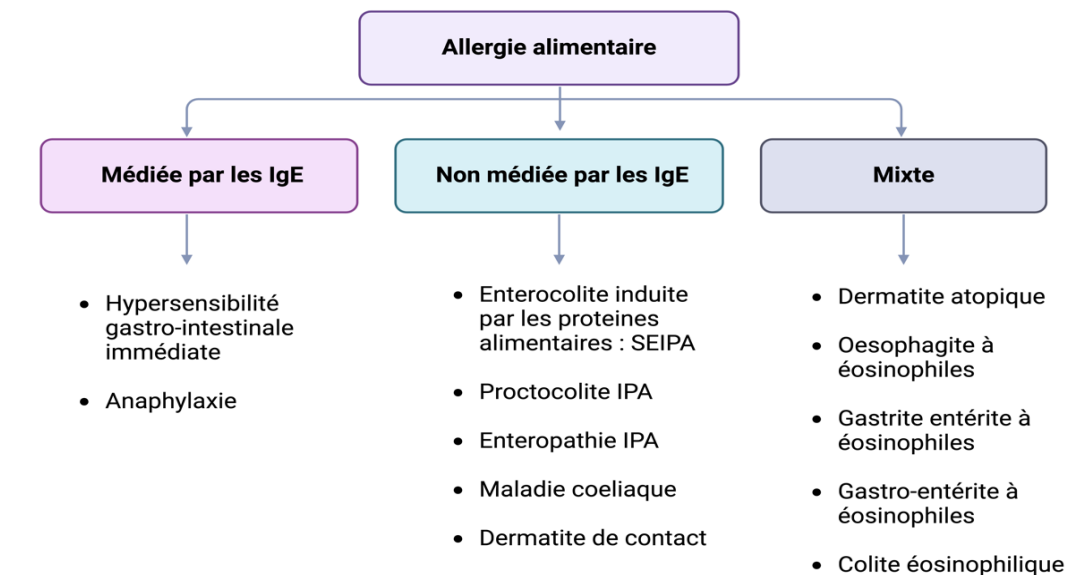
# CHAPITRE 1 – L'allergie alimentaire

## 1.1 Définition de l'allergie alimentaire

L'AA est une réaction immunitaire excessive, pathologique déclenchée par des antigènes protéiques alimentaires habituellement inoffensifs.<sup>1</sup> Elle est également définie comme une absence de la tolérance immunologique à un allergène alimentaire.<sup>24</sup>

Selon les mécanismes immunitaires pathologiques, une allergie alimentaire peut être classée comme médiée par les immunoglobulines (Ig) E – des anticorps impliqués dans les réactions allergiques immédiates –, non médiée par les IgE, et mixtes à médiation IgE et à médiation cellulaire.

<sup>3</sup> Cette classification, ainsi que les principales pathologies associées à chaque type de réponse immunitaire, sont illustrées dans la figure 1.



IgE : Immunoglobuline E  
IPA : Induite par protéines alimentaires

**Figure 1.** Classification des différentes pathologies causées par les allergies alimentaires selon les trois réponses immunitaires. Figure adaptée de Satitsuksanoa, P et *al.*<sup>25</sup> (Fait à l'aide de BioRender ®)

Ce mémoire se concentrera principalement sur les AA médiées par les IgE.

## **1.2 Épidémiologie de l'allergie alimentaire**

L'estimation de la prévalence des AA est très difficile à évaluer due aux différentes définitions attribuées au manque de standardisation. Cependant, il est clair que la prévalence augmente depuis les deux dernières décennies et les pays industrialisés sont plus touchés. <sup>1</sup> L'AA touche principalement les enfants, mais la littérature rapporte qu'un nombre croissant d'adultes est atteint d'AA. <sup>1</sup> La prévalence chez les enfants est de 6 à 10% tandis que chez les adultes elle est de 2 à 5 %. Selon une estimation, environ 220 millions de personnes dans le monde sont atteints d'AA. <sup>1</sup> Parmi les enfants atteints d'AA en Amérique du Nord, 40 % subiraient des chocs anaphylactiques. <sup>26</sup>

Par ailleurs, en fonction des habitudes alimentaires, les allergènes alimentaires peuvent varier, au Mexique par exemple, les enfants ont des réactions allergiques au chocolat, aux fraises, aux crustacés et aux œufs, alors qu'au Salvador, c'est plutôt au piment, aux noix, au chocolat, au lait et aux crevettes. <sup>1</sup>

Tout aliment peut potentiellement déclencher une AA, mais certains aliments sont plus susceptibles de déclencher une réaction, l'allergie au lait de vache est l'AA la plus courante chez les nourrissons et les jeunes enfants, pouvant atteindre 2,5 % des enfants pendant les 2 premières années de vie. <sup>27</sup> L'allergie aux œufs peut atteindre 1 à 2 % des enfants en bas âge. Généralement les allergies aux noix et aux arachides sont étudiées ensemble, car elles sont coexistantes chez 30 à 40 % des patients, et peuvent atteindre un peu plus de 1% des enfants. <sup>27</sup> La prévalence de l'allergie aux arachides a augmenté au fil du temps, passant de 0,4 % en 1997 à 0,8 % en 2002 et à 1,4 % en 2008. <sup>27</sup>

En conséquence, l'incidence des chocs anaphylactiques dus à l'AA a augmenté, 37 % des cas d'admission aux soins intensifs pour anaphylaxie et 79 % des cas d'anaphylaxie récurrente sont dus à une ingestion d'allergènes de source alimentaire.<sup>6</sup>

### **1.3 Facteurs de risque de l'allergie alimentaire**

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés en faveur du développement de l'AA et sont le résultat d'une interaction génétique et environnementale, dont certains sont non modifiables. Parmi ces facteurs non modifiables, on retrouve le sexe des personnes, les garçons étant plus susceptibles de développer une AA, bien que cette tendance s'inverse parfois à l'âge adulte. En outre, des disparités ethniques ont été observées chez les enfants asiatiques, hispaniques et noirs.

<sup>3</sup> Ces enfants présentent des prédispositions génétiques spécifiques qui augmentent leur susceptibilité aux AA. <sup>3</sup> Ces différences ethniques ne sont pas uniquement génétiques; elles peuvent être amplifiées par des facteurs socio-économiques, l'accès limité aux soins de santé, et des différences dans les régimes alimentaires ainsi que les expositions environnementales. <sup>3</sup> Des antécédents familiaux d'atopie exposent à plus de risque de développer des AA. En effet, la marche atopique, qui est définie comme un lien génétique à développer des maladies allergiques dont les allergies, la rhinite allergique, l'asthme et la dermatite atopique s'observent dans les familles où il y a une personne allergique. <sup>28</sup> D'autres facteurs non modifiables ont également été rapportés, comme le fait d'avoir une fratrie plus âgée, qui serait un facteur protecteur contre le développement des AA, car cela exposerait l'enfant à une plus grande diversité de micro-organismes. <sup>3</sup>

Il existe également une autre catégorie de facteurs modifiables, davantage liés à l'environnement et particulièrement aux habitudes alimentaires, qui seraient associés au

développement des AA. Certains de ces facteurs augmenteraient le risque, comme l'insuffisance en vitamine D ou en folates, une consommation insuffisante en graisses alimentaires et en antioxydants, l'obésité infantile, la prise d'antibiotiques ou d'antiacides à un âge précoce, ainsi que le retard dans l'introduction d'aliments connus pour être allergéniques (comme le lait, le blé, les arachides et les œufs). En revanche, d'autres comportements, comme une alimentation variée et équilibrée dès la petite enfance, pourraient contribuer à réduire ce risque. <sup>3</sup>

D'autres facteurs peuvent également influencer, comme le mode d'accouchement, cela pourrait avoir un effet protecteur si c'est par voie naturelle, ou en faveur de développer une AA si c'est par césarienne. L'allaitement maternel pourrait jouer un rôle protecteur. <sup>3,29</sup> En effet, le lait maternel offre des bienfaits pour la santé infantile, mais son effet protecteur contre les AA reste à explorer. <sup>3</sup> Bien que l'allaitement exclusif pendant 3 mois réduise les maladies atopiques, les preuves concernant les AA sont insuffisantes. Les composantes du lait maternel, tels que les oligosaccharides et les IgA, façonnent le microbiote et l'immunité. Les protéines alimentaires maternelles, comme celles du lait de vache, pourraient contribuer à une protection combinée avec les immunoglobulines. <sup>30</sup>

Certaines bactéries du microbiote intestinal peuvent également jouer un rôle protecteur contre les AA, tandis que d'autres pourraient avoir un effet contraire et exposer à des risques d'allergies alimentaires. L'exposition à divers micro-organismes exerce en effet une grande influence sur la composition du microbiote. <sup>3</sup>

Le facteur de risque lié aux AA qui est le plus étudié est l'eczéma, notamment à un âge précoce. Cette condition altère la barrière cutanée, augmentant la perméabilité de la peau aux

allergènes alimentaires et favorisant une sensibilisation allergique par la voie épicutanée. Ce risque a été particulièrement retrouvé chez les enfants présentant des mutations du gène *filaggrin*, associées à une barrière cutanée altérée. <sup>6</sup>

## **1.4 Physiopathologie de l'allergie alimentaire**

La physiopathologie de l'AA médiée par les IgE est une réponse d'hypersensibilité de type 1 à des allergènes alimentaires spécifiques. <sup>31</sup>

Afin de comprendre le mécanisme de l'AA, il est important de connaître le rôle des allergènes alimentaires dans l'induction de la réponse immunitaire. Les allergènes alimentaires sont dérivés de protéines alimentaires naturelles d'origine végétale ou animale. Une fois ingérés, les allergènes alimentaires peuvent être modifiés en différentes structures, traités par les cellules présentatrices d'antigènes pour être exposés au système immunitaire. Le mécanisme de l'allergie alimentaire se divise en deux phases, soit la phase de sensibilisation et la phase de déclenchement qui seront traitées dans les deux prochaines sous-sections.

### **Phase de sensibilisation**

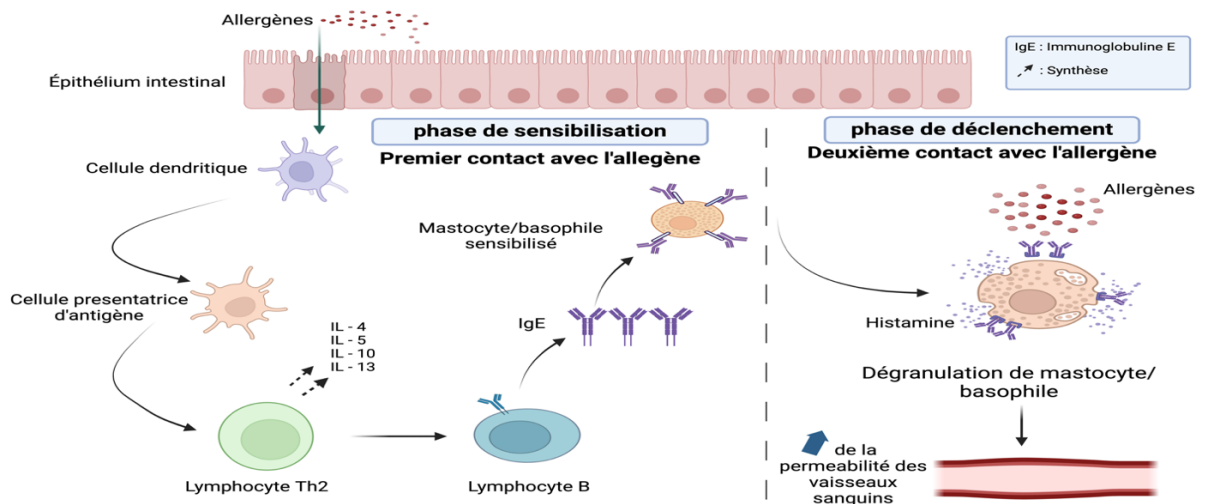
Lors du premier contact avec l'antigène alimentaire qui pénètre par l'épithélium intestinal, ou qui a pénétré par une peau altérée comme dans le cas de l'eczéma, l'antigène alimentaire (Ag) est reconnu comme étranger par les cellules dendritiques, initiant une réponse immunitaire. <sup>31</sup> Les cellules présentatrices d'antigène vont présenter cet Ag aux lymphocytes Th2 qui sont les coordinateurs centraux de cette réponse immunitaire, ce qui provoque la production des cytokines de type interleukine IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. <sup>31</sup> Sous l'influence de ces cytokines, les lymphocytes B

vont se transformer en plasmocytes et produire des IgE. Ces IgE vont se fixer sur les récepteurs à haute affinité FcεR1b des mastocytes ou basophiles les rendant sensibilisés.<sup>31</sup>

### Phase de déclenchement

Au second contact avec le même allergène alimentaire, l'Ag va se lier aux IgE fixés sur les récepteurs des mastocytes ou basophiles, ce qui va provoquer une dégranulation de ces cellules et libérer des médiateurs préformés, comme l'histamine et la tryptase ainsi que des médiateurs néoformés, tels que les leucotriènes et les cytokines pro-inflammatoires.<sup>31</sup> Ce qui va entraîner une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et déclencher une réaction allergique.<sup>31</sup>

Ces processus sont illustrés dans la figure 2, qui résume les étapes clés de la physiopathologie de l'allergie alimentaire.



**Figure 2.** Représentation schématique des deux phases de la physiopathologie de l'allergie alimentaire. (Fait à l'aide de Biorender ®)

## 1.5 Symptomatologie de l'allergie alimentaire

Les réactions allergiques à médiation d'IgE sont caractérisées par leur rapidité, de quelques minutes à moins de deux heures après l'ingestion de l'allergène alimentaire.<sup>32</sup>

La symptomatologie est très variable pouvant se manifester par des réactions cutanées légères allant jusqu'à des réactions sévères systémiques comme l'anaphylaxie causant le décès de la personne.<sup>3,32</sup> La nature et la gravité des symptômes sont influencées par plusieurs facteurs intrinsèques dont l'âge, les adolescents et les jeunes enfants étant le plus à risque, les conditions de comorbidité en rapport avec les antécédents du patient et des facteurs extrinsèques comme la nature de l'allergène (source et forme) et la quantité.<sup>33</sup> Ainsi, les réactions graves sont le plus souvent signalées après ingestion des arachides, des noix, du poisson et des crustacés et les huiles ou les beurres provoquent souvent des réactions plus importantes.<sup>33</sup>

À noter qu'un ou plusieurs organes et systèmes peuvent être affectés<sup>32</sup>, le tableau 2 résume les différents symptômes retrouvés en cas d'atteinte de chaque organe.

**Tableau 2.** Symptômes de l'allergie alimentaire selon l'organe ciblé.

Organe/système ciblé	Symptômes
Cutané	Érythème, prurit, urticaire, éruption cutanée
Oculaire et oropharynx	Prurit, œdème, gonflement de la langue
Voies respiratoires	Dyspnée, toux, sifflement, rhinorrhées
Cardio-vasculaire	Tachycardie, hypotension, pâleur, syncope
Neurologique	Confusion, anxiété, perte de connaissance
Gastro-intestinal	Nausée, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales

## 1.6 Diagnostic de l'allergie alimentaire

L'étape la plus importante pour diagnostiquer une AA demeure l'histoire clinique. L'anamnèse détaillée est l'étape cruciale pour établir un diagnostic, car elle permet de recueillir des informations cruciales sur les antécédents médicaux personnels et familiaux d'atopie du patient qui incluent l'asthme, la rhinite allergique et la dermatite atopique, ces antécédents augmentent le risque de développer une allergie alimentaire.<sup>29</sup> Elle permet également de recueillir les éléments déclencheurs potentiels en s'informant sur le mode de vie des personnes et leurs habitudes alimentaires.<sup>33</sup> Ainsi, la nature des symptômes (cutanée, gastro-intestinale, respiratoire ou systémique) et la chronologie des manifestations sont notées.<sup>31</sup> Le lien temporel entre l'exposition à l'allergène alimentaire et l'apparition des symptômes est important pour reconnaître une AA médiée par les IgE, qui se manifeste par une réaction rapide, généralement dans les minutes suivant l'ingestion, et au plus tard dans les deux heures.<sup>31</sup>

Par ailleurs, en raison de la subjectivité des symptômes rapportés, l'anamnèse seule n'est pas suffisante pour établir un diagnostic définitif, elle doit être corroborée par des tests objectifs, tels que les tests cutanés et le dosage des IgE spécifiques.<sup>34</sup>

Le dosage des IgE spécifiques est un test diagnostique couramment utilisé pour quantifier les anticorps IgE spécifiques à divers allergènes.<sup>34</sup> C'est un test sanguin qui détecte la présence d'IgE dirigées contre un allergène particulier dans le sérum du patient, les résultats sont exprimés en kiloUnités par litre, et un seuil de détection est défini, au dessus duquel la présence d'une sensibilisation clinique est suspectée.<sup>34</sup> Il est particulièrement utilisé chez les enfants ayant des



antécédents de dermite atopique sévère ou sous traitement antihistaminique.<sup>34</sup> En revanche, un résultat au-dessus du seuil n'indique pas nécessairement une manifestation clinique liée à l'AA.<sup>34</sup>

Les tests cutanés à la piquûre, ou « prick test », consistent à introduire des extraits d'allergènes dans l'épiderme à l'aide de scarification pour mettre en contact l'allergène et les cellules inflammatoires<sup>35</sup>. La formation d'une papule (*wheal*) et d'une rougeur (*flare*)  $\geq 3$  mm de diamètre après 10 minutes d'exposition indique une sensibilisation.<sup>35</sup> Ce test présente une sensibilité supérieure à 90 %, ce qui en fait un outil efficace pour diagnostiquer les AA médiées par les IgE.<sup>36</sup> Il est peu coûteux et offre des résultats immédiats, mais sa spécificité, inférieure à 50 %, peut entraîner de faux positifs et des restrictions alimentaires inutiles.<sup>36</sup>

Le test de provocation orale est considéré comme le standard reconnu pour confirmer une allergie alimentaire.<sup>37</sup> Il consiste à faire consommer progressivement l'aliment suspecté sous supervision médicale.<sup>37</sup> Ce test, bien que fiable, est long à réaliser et peut provoquer des réactions allergiques, incluant l'anaphylaxie.<sup>38</sup> Malgré ces risques, il est sûr lorsqu'il est réalisé par des spécialistes expérimentés. Il existe plusieurs types de tests de provocation. Le test ouvert, où le patient et le médecin savent quel aliment est testé, est le plus simple à mettre en œuvre. Le test en simple aveugle, où seul le médecin connaît l'aliment testé, est une autre option. Enfin, le test en double aveugle contrôlé par placebo, où ni le médecin ni le patient ne savent quel aliment est testé, est considéré comme le plus spécifique. Cependant, en raison de sa complexité, ce dernier est rarement utilisé en pratique clinique.<sup>39</sup>

## 1.7 Traitement de l'allergie alimentaire

L'approche actuelle dans la gestion des allergies alimentaires repose sur l'éviction de l'allergène alimentaire responsable des réactions allergiques.<sup>40</sup> L'éviction d'un allergène nécessite une éducation importante de la personne allergique et de son entourage<sup>7,40,41</sup>. En outre, l'évitement des allergènes exerce des pressions sur l'enfant atteint de l'allergie alimentaire, son entourage ainsi que les fabricants d'aliments et les espaces publics.<sup>40</sup> Dans une étude portant sur 512 nourrissons atteints d'une allergie alimentaire probable au lait ou aux œufs, sur une période de suivi de 36 mois, 72 % des personnes signalent 1171 réactions, dont 56 % d'entre eux ont signalé plus d'une réaction.<sup>40</sup> La plupart des réactions ont été attribuées à un manque de vigilance ; erreur de vérification de l'étiquette, ingestion involontaire, contact croisé dans la préparation des repas.<sup>40</sup>

Cette approche de gestion de l'éviction entraîne 20 % des enfants ayant des allergies alimentaires à consulter aux urgences chaque année et 40 % de toutes les personnes questionnées dans l'étude ont signalé au moins une réaction allergique grave conduisant à une visite aux urgences au cours de leur vie.<sup>34</sup> Ainsi, la qualité de vie des enfants atteints d'allergie alimentaire est altérée en raison des contraintes liées à leur mode de vie et du stress engendré par le risque d'accidents allergiques. À cet effet, selon l'étude Shemesh *et al.* 45 % des enfants souffrant d'allergie alimentaire ont déclaré avoir été victimes d'intimidation.<sup>34</sup> Cela peut entraîner de l'anxiété, voire même de l'isolement social.<sup>42</sup>

Par ailleurs, détenir un auto-injecteur d'adrénaline pour les personnes à risque de choc anaphylactique fait également partie de la gestion des allergies alimentaires. Il a été rapporté que, lorsque l'épinéphrine est prescrite, elle n'est portée que par la moitié des personnes et que les

erreurs d'utilisation sont fréquentes par les personnes et le personnel médical.<sup>6</sup> Après avoir injecté de l'épinéphrine, l'individu doit être transporté aux urgences pour une observation et également pour recevoir des médicaments supplémentaires en fonction des symptômes et de la gravité, comme des bronchodilatateurs, des antihistaminiques, des corticostéroïdes, de l'oxygène, des liquides intraveineux, des vasopresseurs, du glucagon ou de l'atropine.<sup>6,43</sup>

Pour terminer, plusieurs approches thérapeutiques sont en cours d'essai et sujets d'études afin d'améliorer la prise en charge des allergies alimentaires.<sup>42</sup> L'immunothérapie spécifique aux allergènes est actuellement la forme de traitement la mieux étudiée pour les allergies alimentaires. Elle implique l'administration d'un allergène pour modifier la réponse immunitaire en augmentant le seuil de réactivité.<sup>42</sup>

Il existe différents types d'immunothérapie, en fonction de la voie d'administration, à savoir l'immunothérapie orale (ITO), l'immunothérapie sublinguale et l'immunothérapie épicutanée.<sup>31</sup> Le but de l'immunothérapie est d'atteindre un état de tolérance pour lequel l'individu ne manifestera plus de réaction après ingestion d'une portion normale de l'aliment responsable de la réaction immunitaire.<sup>42</sup> En revanche, si la tolérance n'est pas atteinte, on parle de désensibilisation, qui est associée à la capacité d'assumer en toute sécurité l'allergène, dépendamment de la quantité ingérée, laquelle est variable pour les personnes (valeur seuil), mais permet les contacts accidentels sans choc anaphylactique.<sup>31</sup>

## Efficacité de l'immunothérapie orale dans les allergies alimentaires

Pour évaluer l'efficacité de l'ITO, il est essentiel de comprendre et différencier les définitions de la désensibilisation, de la tolérance soutenue et de l'acquisition de la tolérance.

La **désensibilisation** est l'augmentation du seuil de réaction à un allergène alimentaire pendant la prise d'un traitement actif et pourrait protéger contre l'ingestion accidentelle de l'allergène. La **tolérance soutenue** est une absence de réaction clinique à un allergène alimentaire après l'arrêt du traitement actif. Par ailleurs, **l'acquisition de la tolérance** est une absence totale de réactivité clinique à un allergène alimentaire ingéré.<sup>41</sup>

Diverses études sur l'ITO ont rapporté qu'environ 80 % des participants réussissent à obtenir une désensibilisation. Parmi eux, environ 30 à 50 % parviennent à atteindre une tolérance soutenue.<sup>9</sup> Cependant, 10 à 15 % des participants ne parviennent pas à se désensibiliser et peuvent abandonner l'ITO en raison d'événements indésirables persistants liés aux doses, tels que des symptômes gastro-intestinaux.<sup>9</sup>

### Types d'immunothérapie

#### 1.7.1.1 L'immunothérapie sublinguale

Elle consiste à maintenir l'allergène sous la langue pendant une période de deux minutes où il est absorbé par la muqueuse orale, puis avalé par la personne. Bien que l'immunothérapie sublinguale induise la désensibilisation pour une certaine proportion de personnes, particulièrement les jeunes enfants, elle ne serait pas aussi efficace que l'ITO.<sup>31</sup> En effet, selon les travaux menés par Burks et al, la tolérance n'a été atteinte que chez 11% des patients.<sup>44</sup>

### **1.7.1.2 L'immunothérapie épicutanée**

Cette méthode consiste à appliquer un dispositif cutané (*patch*) contenant des allergènes alimentaires qui aide à moduler le système immunitaire par le biais de la peau, elle permet d'activer les cellules de Langerhans, qui migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour réguler négativement les réponses des cellules effectrices, ce qui réduit les réactions excessives associées aux allergies.<sup>45</sup>

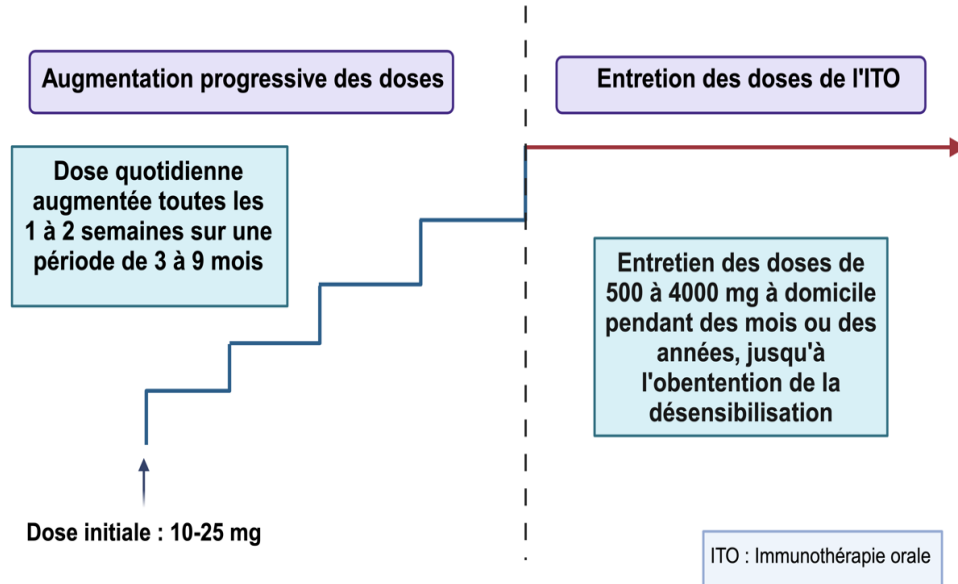
Le dispositif est changé toutes les 24 à 48 heures, avec une durée de traitement variant entre 12 et 36 mois, selon les protocoles des essais cliniques.<sup>31,45</sup>

### **1.7.1.3 L'immunothérapie orale (ITO)**

L'immunothérapie orale consiste à ingérer un allergène par voie orale, à des doses croissantes. Les protocoles d'ITO comprennent une phase d'escalade initiale à une dose de 0.1 à 25mg, suivie d'une phase de montée de dose, laquelle est augmentée progressivement toutes les 1 à 2 semaines sur une période de trois à neuf mois. Par la suite, une phase de maintien où une dose dite de maintien, qui varie entre 300 à 4000 mg, est appliquée pour quelques mois à plusieurs années jusqu'à l'obtention d'une désensibilisation. La figure 3 résume les différentes phases de l'ITO.<sup>41</sup>

Les effets indésirables sont plus fréquents avec l'immunothérapie orale qu'avec l'immunothérapie épicutanée et sublinguale, elle demeure la plus utilisée, car le taux de désensibilisation est plus élevé.<sup>41</sup> Enfin, les essais cliniques où des preuves de son efficacité dans la gestion des allergies alimentaires sont démontrées sont plus nombreux.<sup>31,41</sup>

La figure 3 présente de manière synthétique les principales étapes du protocole d'immunothérapie orale, incluant les phases d'escalade initiale, de montée de dose et d'entretien.



**Figure 3.** Processus de l'immunothérapie orale. (Faite à l'aide de Biorender ®)

## CHAPITRE 2 – Le microbiote intestinal

### 2.1 Composition du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal (MI) est l'ensemble des micro-organismes vivant dans le tractus gastro-intestinal humain.<sup>10</sup> Le MI représente environ 2 kg du poids corporel.<sup>10</sup> Il se compose de champignons, de virus et de quelques archées, mais les bactéries en sont le composant le plus important et constituent le groupe le plus nombreux. En effet, on y trouve au moins 300 à 1000 espèces de bactéries différentes, avec plus de 7000 souches distinctes de bactéries.<sup>10</sup>

Les concentrations des diverses souches varient d'une section à l'autre du tractus gastro-intestinal et cette diversité serait associée aux conditions variables, telles que le pH et la disponibilité en nutriments.<sup>46</sup> Par exemple, on observe de faibles concentrations de bactéries dans l'estomac et le duodénum (jusqu'à  $10^3$  unités formant colonies par millilitre, CFU/ml).<sup>46</sup> Les concentrations augmentent dans le jéjunum et l'iléon ( $10^4$  à  $10^8$  CFU/ml) et atteignent leur maximum dans le côlon (jusqu'à  $10^{14}$  CFU/ml), soit une quantité dix fois supérieure au nombre total de cellules somatiques et germinales humaines.<sup>46</sup>

La majorité des bactéries du MI appartiennent soit au phylum Firmicutes (incluant *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Ruminococcus*), soit au phylum Bacteroides (notamment *Bacteroides* et *Prevotella*) avec une représentativité respective des deux phylums de 60–75 % et 30–40 %, représentant ensemble plus de 90 % des bactéries présentes dans l'intestin humain. Bien que la composition du microbiote intestinal varie considérablement entre les enfants, des études récentes ont révélé que plus de cinquante taxons peuvent être retrouvés chez près de la moitié des personnes échantillonnées.<sup>47,48</sup>

Le développement du MI commence dès la vie fœtale, comme en témoignent des études rapportant la présence d'ADN bactérien dans le placenta, le liquide amniotique et le méconium des nouveau-nés, y compris ceux nés par césarienne.<sup>12</sup> Par la suite, le microbiote maternel pourrait influencer le profil transcriptionnel du microbiote fœtal. Après la naissance, le microbiote intestinal évolue rapidement : il contient environ  $10^7$  bactéries par gramme de selles le premier jour de vie,  $10^9$  par gramme le troisième jour,  $10^{10}$  par gramme le septième jour, et atteint  $10^{11}$  par gramme à six mois, un niveau proche de celui des adultes.<sup>12</sup>

Chez l'adulte, le MI est principalement dominé par le phylum Firmicutes, tandis que chez les enfants, c'est le phylum Actinobacteria qui est le plus abondant. Cette dominance d'Actinobacteria diminue progressivement avec la diversification alimentaire, permettant au microbiote de se transformer en un microbiote de type adulte vers l'âge de trois ans.<sup>12</sup> Le microbiote établi à cet âge est généralement maintenu jusqu'à l'âge adulte, ce qui souligne l'importance de favoriser un MI équilibré dès la petite enfance par une alimentation variée, car une dysbiose peut persister jusqu'à l'âge adulte.<sup>12</sup>

## **2.2 Rôle du microbiote intestinal**

La relation entre le microbiote intestinal (MI) et l'hôte est souvent décrite comme commensale (un partenaire en profite sans affecter l'autre) plutôt que mutualiste (une interaction dans laquelle les deux partenaires tirent des bénéfices), cela reflète le manque de connaissances sur les fonctions du MI et ses interactions avec l'hôte.<sup>10</sup>



Cependant, de plus en plus de recherches démontrent que le MI est essentiel au développement intestinal, à l'homéostasie et à la protection contre les pathogènes, au point que certains chercheurs le considèrent comme un « organe supplémentaire » de l'hôte.<sup>46</sup>

De plus, le MI joue un rôle crucial dans le processus métabolique, physiologique, nutritionnel et immunologique. En contrepartie, les perturbations dans la composition du microbiote influencent la santé.<sup>48</sup> En ce qui concerne le processus métabolique, il contribue à la fermentation des polysaccharides complexes non digestible par l'humain, produisant ainsi des acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, l'acétate, et le propionate. Il est également impliqué dans la biotransformation des acides biliaires conjugués et à la synthèse de certaines vitamines K et vitamines du groupe B, telles que la biotine, la folate et la riboflavine.<sup>46</sup>

Le MI a aussi des effets trophiques sur l'épithélium intestinal, favorisant le développement des microvillosités, ce qui augmente la surface d'absorption de nutriments, améliore la digestion, et renforce la barrière intestinale, ce qui protège contre les agents pathogènes.<sup>46</sup> Il empêche la colonisation de l'intestin par des micro-organismes pathogènes en occupant les niches écologiques en produisant des substances antimicrobiennes, comme les bactériocines et les acides organiques.

10,46

Sur le plan immunologique, le MI influence le développement et la maturation du système immunitaire, en particulier en favorisant la tolérance aux antigènes alimentaires et en modulant l'inflammation. L'intégrité de la barrière intestinale est étroitement liée à la composition du microbiote : un microbiote équilibré maintient une barrière forte, empêchant la pénétration d'agents pathogènes et d'allergènes dans la circulation sanguine.<sup>49</sup>

Cependant, en cas de dysbiose, l'intégrité de la barrière intestinale est compromise, ce qui peut entraîner un phénomène d'hyperperméabilité intestinale (*leaky gut*).<sup>49</sup> Ce phénomène facilite la translocation des allergènes alimentaires et des endotoxines bactériennes dans le sang, stimulant des réponses immunitaires inappropriées et favorisant le développement de l'inflammation chronique.<sup>49</sup> Ces changements peuvent entraîner une sensibilisation accrue aux allergènes et des perturbations du microbiote intestinal, influençant la production de cytokines pro-inflammatoires et exacerbant ainsi les réponses immunitaires, ce qui contribue au développement des allergies alimentaires.<sup>10,49</sup>

Les mécanismes par lesquels le MI influence la pathogenèse des allergies alimentaires incluent également la modulation de la maturation des cellules T régulatrices (Treg), qui jouent un rôle critique dans le maintien de la tolérance immunitaire.<sup>46,49</sup> Une diminution de la diversité microbienne, souvent observée chez les individus allergiques, a été associée à une réduction de ces cellules Treg, suggérant que la restauration de la diversité microbienne pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir ou traiter les allergies alimentaires.<sup>49</sup>

## **2.3 Facteurs influençant le microbiote intestinal**

La composition du microbiote intestinal (MI) peut être influencée par une multitude de facteurs, notamment des facteurs liés à l'hôte ou à l'environnement.

## L'âge

La composition du MI évolue considérablement après la naissance et avec l'âge.<sup>12</sup> Une étude d'Odamaki *et al.*, basée sur l'analyse de 367 échantillons fécaux d'enfants japonais âgés de 0 à 104 ans, a révélé des variations liées à l'âge.<sup>50</sup> Chez les adultes, les Firmicutes dominent, tandis que, chez les enfants d'un an, les Actinobacteria, notamment les Bifidobactéries, prédominent.<sup>50</sup> La proportion d'Actinobacteria diminue après le sevrage, le microbiome évoluant vers un profil adulte à l'âge de 3 ans et restant relativement stable par la suite.<sup>50</sup> Il est crucial de souligner que toute dysbiose survenant tôt dans la vie peut persister jusqu'à l'âge adulte, renforçant l'importance de l'établissement d'un microbiote intestinal équilibré dès la petite enfance.<sup>51</sup>

## L'alimentation

Plusieurs études interventionnelles montrent que les changements alimentaires entraînent des changements dans la composition du MI.<sup>52</sup> Il a également été démontré qu'un régime riche en fibres est bénéfique pour la santé, car il module le microbiome.<sup>53</sup> Wu *et al.*, ont démontré que les régimes riches en protéines et en graisses animales étaient liés à une prédominance de *Bacteroides*, tandis que les régimes riches en glucides favorisaient *Prevotella*.<sup>52</sup> Dans leur étude, ils ont également évalué l'impact d'une alimentation contrôlée sur 10 participants et démontré que la composition du MI pouvait changer en seulement 24 heures après l'introduction d'un régime riche en graisses et pauvre en fibres, ou inversement pauvre en graisses et riche en fibres.<sup>52</sup> Ils ont également observé que ces changements se maintiennent tout au long des 10 jours de l'étude, ce qui suggère que le régime alimentaire influence fortement la répartition des entérotypes.<sup>52</sup>

## La grossesse, le microbiote maternel, le mode d'accouchement et l'allaitement

L'exposition aux microbes débute dès la grossesse.<sup>54</sup> En effet, le développement du MI est influencé par plusieurs facteurs et ce, dès la grossesse.<sup>55</sup> Il peut jouer un rôle dans l'inhibition de la tolérance, ce qui entraîne une sensibilisation aux allergènes, cependant, il peut également faciliter le rétablissement de la tolérance.<sup>11</sup> Des études antérieures ont révélé la présence de groupes microbiens spécifiques dans le placenta et le méconium, ce qui met en évidence le rôle potentiel du microbiote maternel dans la colonisation précoce du fœtus.<sup>54</sup>

Le mode d'accouchement influence significativement la composition du MI des nouveau-nés.<sup>11</sup> Dans une étude portant sur 36 nouveau-nés, le microbiote intestinal a été comparé en fonction du mode d'accouchement à partir d'échantillons de selles prélevés quatre jours après la naissance et analysés par séquençage de l'ARNr 16S.<sup>56</sup> Les résultats montrent une plus forte proportion de bactéries des ordres *Bacteroidales* et *Enterobacterales* chez les enfants nés par voie naturelle, tandis que les ordres *Bacillales* et *Lactobacillales* sont plus abondants chez ceux nés par césarienne.<sup>56</sup> Ces bactéries diffèrent par leur origine : les *Bacteroidales* et *Enterobacterales* proviennent du vagin ou des intestins de la mère, tandis que les *Bacillales* et *Lactobacillales* sont associées à la peau et à la cavité buccale.<sup>56</sup>

Le lait maternel et le colostrum jouent également un rôle important dans le développement du MI.<sup>11</sup> Loin d'être stérile, il contient des bactéries commensales, telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* et *Enterococcus* transférés au nouveau-né par l'allaitement.<sup>57</sup> Dans une étude longitudinale de 12 mois, il a été démontré que 27,7 % des bactéries intestinales retrouvées chez les nourrissons allaités provenaient du lait maternel et 10,4 % de la peau aréolaire au cours du premier mois de vie.<sup>58</sup> Les IgA sécrétées présentes dans le lait maternel ont un rôle protecteur contre les agents pathogènes, et peuvent également favoriser le développement du microbiote chez les nouveau-nés.<sup>59</sup>

## L'utilisation des antibiotiques

Bien que l'impact des antibiotiques sur le MI soit largement reconnu, leur effet réel a été initialement décrit par Dethlefsen *et al.* en 2008.<sup>60</sup> L'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse est associée à un risque accru de troubles allergiques chez les enfants.<sup>61</sup> Cette problématique est exacerbée par l'utilisation croissante d'antibiotiques intrapartum, notamment en prophylaxie pour le streptocoque du groupe B, lors de ruptures des membranes ou dans le cadre d'accouchements par césarienne.<sup>62,63</sup> Les nourrissons nés de mères recevant des antibiotiques intrapartum possèdent de faibles niveaux de *Bacteroides* et des niveaux élevés d'*Enterococcus* et de *Clostridium* et ce, 3 mois après l'utilisation d'antibiotiques par la mère. Ces observations corroborent les résultats des études sur la dysbiose.<sup>63</sup>

Dans les pays développés, les nourrissons reçoivent fréquemment plusieurs cycles d'antibiotiques au cours des deux premières années de leur vie, ce qui peut entraîner des perturbations immunologiques significatives.<sup>11</sup> La période néonatale est particulièrement critique.<sup>64</sup> Stefka *et al.* ont démontré que les antibiotiques au cours de la première année de vie réduisaient la diversité et la quantité des micro-organismes dans les échantillons fécaux et iléaux, tout en augmentant la sensibilisation aux allergènes alimentaires.<sup>64</sup> Love *et al.* ont également rapporté que les enfants ayant reçu cinq prescriptions d'antibiotiques ou plus durant leur première année de vie étaient significativement plus susceptibles de développer une allergie alimentaire, avec un impact plus marqué pour les céphalosporines et les sulfamides.<sup>65</sup> Par ailleurs, l'effet des antibiotiques varie selon l'âge : la pénicilline et les céphalosporines sont associées aux allergies alimentaires chez les enfants de moins de 2 ans, tandis que les macrolides augmentent ce risque plus tard dans l'enfance.

## **Facteurs environnementaux et génétiques**

L'abondance bactérienne du microbiome est en partie déterminée par la constitution génétique de l'hôte, influençant ainsi son métabolisme et son état de santé.<sup>67</sup> Il a été observé que les membres d'une même famille partagent des communautés microbiennes intestinales plus similaires que celles d'enfants non apparentés.<sup>67</sup> De plus, le microbiome des jumeaux monozygotes présente une ressemblance plus marquée que celui des jumeaux dizygotes.<sup>67</sup>

Les facteurs environnementaux, comme l'exposition à un âge précoce aux animaux domestiques et aux frères et sœurs plus âgés sont associés à une augmentation de la quantité et de la diversité microbiennes et à une réduction du risque de maladies allergiques.<sup>68</sup> Ces observations suggèrent qu'une exposition environnementale réduite expliquerait une moins grande diversité microbienne ce qui pourrait freiner le développement du système immunitaire.<sup>68</sup>

Dans le prochain chapitre, une section sera consacrée pour présenter les principaux facteurs modulant la diversité microbienne intestinale.

## **CHAPITRE 3 – Rôle du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires**

### **3.1 Le mécanisme du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires**

Le microbiote intestinal (MI) régule de manière critique les réponses immunitaires liées aux allergies alimentaires (AA) (et en particulier la forme systémique de réaction allergique – l'anaphylaxie). Cette régulation passerait principalement par le contrôle de la tolérance orale, qui est, comme définie précédemment, le processus par lequel le corps s'abstient de développer une réponse immunitaire contre les antigènes alimentaires.<sup>12,69</sup> La tolérance et la sensibilité aux allergènes alimentaires seraient, en grande partie, sous le contrôle des bactéries intestinales commensales par le biais de voies moléculaires et métaboliques de ces bactéries.<sup>12,69</sup>

Chez les enfants en bonne santé, les bactéries intestinales productrices de butyrate aident à maintenir la tolérance immunitaire sous contrôle.<sup>12</sup> Ces acides gras à chaîne courte sont produits par la fermentation des fibres alimentaires et ont un effet sur la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg), empêchant principalement l'activation exagérée du système immunitaire contre les antigènes alimentaires.<sup>12</sup> Le butyrate est particulièrement produit par *Faecalibacterium* et *Clostridium* et il améliore fortement l'acétylation des histones qui va stimuler l'expression de Foxp3, qui est un facteur de transcription vitale des cellules Treg.<sup>12</sup>

La dysbiose est présente chez de nombreuses personnes allergiques, ce qui signifie qu'il y a une perturbation du microbiome dont le résultat est une diminution de la diversité microbienne et en particulier du nombre de bactéries productrices d'AGCC.<sup>11,12,69</sup> Cette diminution des AGCC,

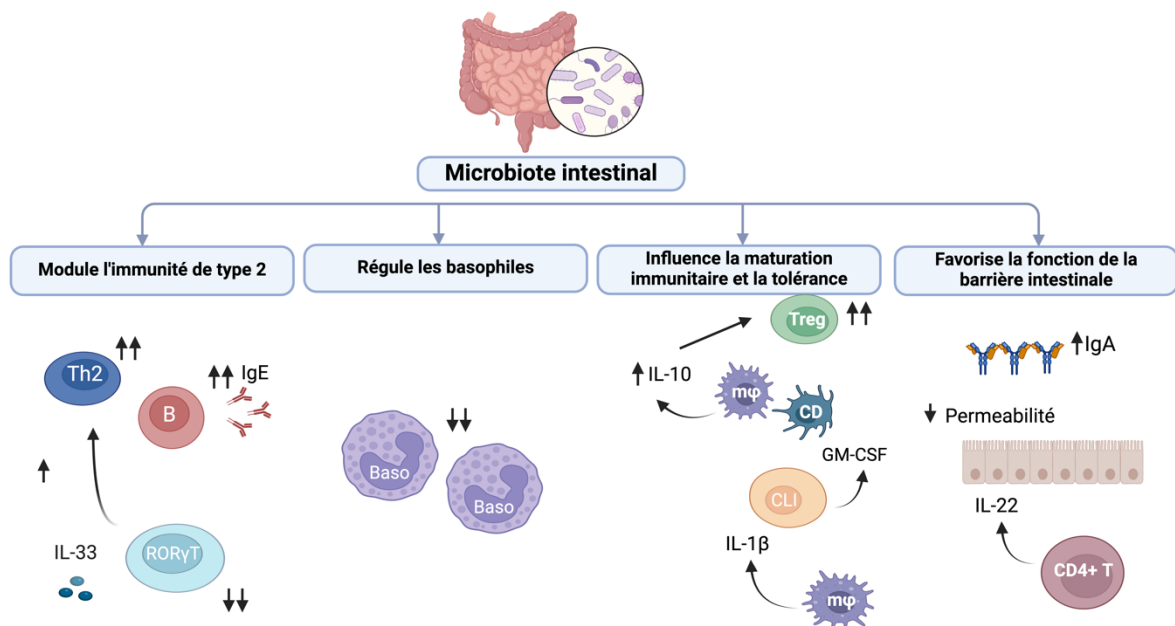
spécifiquement du butyrate et du propionate, perturbe l'équilibre immunitaire et l'efficacité de la barrière intestinale.<sup>69</sup>

L'altération de la barrière que forme l'épithélium intestinal est souvent observée dans le cas de personnes qui ont des allergies alimentaires, celle-ci permet aux allergènes de traverser plus facilement l'épithélium intestinal et donc d'être en contact direct avec le système immunitaire.<sup>69</sup> Cela déclenche une réponse immunitaire biaisée en faveur des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) qui augmente la production d'IgE spécifiques aux allergènes.<sup>69</sup> Ces IgE, par leur fixation aux mastocytes et aux basophiles, sensibilisent l'organisme aux réactions allergiques en libérant des médiateurs inflammatoires en grandes quantités.<sup>69</sup> Outre les AGCC, les métabolites microbiens sont également importants pour la tolérance alimentaire.<sup>11</sup> Par exemple, les produits du métabolisme du tryptophane par certaines bactéries intestinales, notamment l'indole et la kynurénine, aident à réguler l'intégrité de la barrière épithéliale.<sup>11</sup> L'indole améliore la production d'IL-22 par l'activation de l'aryl hydrocarbon receptor (AHR), qui augmente la production de mucine par les cellules caliciformes pour ainsi fortifier la barrière intestinale contre les allergènes alimentaires.<sup>12</sup>

De plus, les acides biliaries secondaires, qui sont convertis à partir des acides biliaries primaires produits par le foie en induction de cellules Treg dans l'intestin.<sup>12</sup> Les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  régulent à la baisse la réponse inflammatoire et aident à maintenir la tolérance aux antigènes alimentaires en répondant à ce signal « instructif ».<sup>12</sup>

Ces mécanismes illustrent la manière dont le microbiote intestinal influence la régulation de l'immunité et la sensibilité aux allergènes, comme représenté dans la Figure 4.





B : Cellules B, Baso : Cellules basophiles, CD : Cellules dendritiques, CD4+ T : Cellules T auxiliaires CD4+, CLI : Cellule lymphatique innée GM-CSF : Cytokine stimulant granulocytes et macrophages, IgA : Immunoglobulines A, IgE : Immunoglobulines E, IL : Interleukines, mφ : Macrophages, RORγT : Facteur de transcription des Th17, Th2 : Cellules T régulatrices

**Figure 4.** Mécanismes d'action du microbiote intestinal sur la réponse immunitaire et la sensibilité aux allergènes alimentaires. Le microbiote module l'immunité de type 2, régule l'activité des basophiles, influence la maturation immunitaire (via les cellules dendritiques, les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes T innés), et favorise l'intégrité de la barrière intestinale par la production d'IgA et l'induction de cytokines comme l'IL-22. (Faite à l'aide de Biorender ®)

### 3.2 Diversité microbienne intestinale chez l'enfant

Plusieurs études de séquençage ont révélé que les enfants avec ou sans AA ont des structures de MI significativement différentes, et que la dysbiose intestinale pouvait précéder l'apparition de l'AA.<sup>69</sup>

Une recherche effectuée par Goldberg MR *et al.*, faite chez des enfants atteints d'AA et des témoins sans AA de même âge a démontré que la diversité  $\alpha$  et  $\beta$  étaient significativement différentes entre les deux groupes.<sup>70</sup> En effet, *Prevotella copri* était l'espèce la plus représentée

dans le groupe de sans AA, tandis que le groupe allergique présentait plutôt des niveaux élevés de *Collinsella aerofaciens*, *Dorea ormicigenans*, *Methanobrevibacter* non classé, *Blautia obeum* et *Coprococcus catus*. De plus, les auteurs ont mentionné que *P. copri* était lié aux trois AGCC et que les niveaux de ces derniers étaient plus faibles chez les personnes AA que chez celles sans AA.<sup>70</sup>

Dans une autre recherche réalisée par Ling Z et al, où on a étudié la différence de la composition du MI chez des enfants atteints d'une AA à médiation d'IgE à celle des enfants sans AA, les auteurs ont montré que *Clostridium sensu stricto* et *Anaerobacter* augmentaient, tandis que *Bacteroides* et *Clostridium XVIII* diminuaient chez les enfants atteints d'AA comparativement aux enfants sans AA.<sup>20</sup>

Dans une autre recherche menée par De Filippis et al, utilisant une approche de métagénomique par séquençage de type fusil de chasse, les caractéristiques spécifiques du microbiome intestinal ont été décrites chez des enfants atteints d'allergies alimentaires ou d'allergies respiratoires.<sup>71</sup> Les résultats ont montré des différences significatives entre le microbiome des patients allergiques et des contrôles sains, avec des abondances plus élevées de *Faecalibacterium prausnitzii* et de *Ruminococcus gnavus* chez les enfants allergiques, tandis que les niveaux de *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides dorei*, *B. vulgatus*, et de plusieurs autres taxons dégradant les fibres étaient plus faibles.<sup>71</sup>

Le tableau 3 présente les résultats de plusieurs études antérieures ayant comparé la diversité microbienne intestinale entre des enfants atteints d'allergie alimentaire (AA) et des témoins non allergiques. Ces travaux mettent en lumière des différences significatives dans la composition et la richesse du microbiome intestinal.

**Tableau 3.** Résultats des différences de la diversité microbienne intestinale rapportés dans les études de cohortes cas-témoins sur l’allergie alimentaire (AA).

Cohortes étudiées	Composition du microbiome intestinal chez les personnes ayant une ou des AA comparativement aux personnes sans AA	Références
Cohorte de 233 enfants atteints d'AA et 58 témoins sans AA	<b>Familles :</b> ↑ <i>Erysipelotrichaceae</i> ↓ <i>Enterobacteriaceae</i> <b>Genres :</b> ↑ <i>Adlercreutzia</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Turicibacter</i> ↓ <i>Enterococcus</i> <b>Espèces :</b> ↑ <i>Collinsella aerofaciens</i> , <i>Dorea formicigenerans</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Blautia obeum</i> , <i>Coprococcus catus</i> ↓ <i>Prevotella copri</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Goldberg et al. <sup>70</sup>
Cohorte de 34 enfants atteints d’AA et 45 témoins sans AA	<b>Phylums :</b> ↑ Firmicutes, Fusobacteria ↓ Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia <b>Familles :</b> ↑ <i>Clostridiaceae 1</i> , <i>Cytophagaceae</i> , <i>Nocardiaceae</i> <b>Genres :</b> ↑ <i>Clostridium sensu stricto</i> , <i>Anaerobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Clostridium XIVa</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Clostridium XVIII</i> , <i>Flavonifractor</i> ↓ <i>Bacteroides</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Blauti</i> , <i>Clostridium XI</i> , <i>Lachnospiraceae incertae sedis</i>	Ling Z et al. <sup>20</sup>
Cohorte de 225 enfants de 3ans (87 ayant une sensibilité alimentaire et 14 ont une AA)	<b>Genres :</b> ↓ <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Dialister</i> , <i>Dorea</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Oscillospira</i>	Savage et al. <sup>72</sup>
Cohorte de 90 enfants atteints d’AA ou d’asthme allergique et 30 témoins sans AA du même âge	<b>Phylums :</b> ↑ Firmicutes, Bacteroidota (mixte, certaines espèces augmentent) ↓ Actinobacteria, Bacteroidota (certaines espèces diminuent) <b>Familles :</b> ↑ <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Veillonellaceae</i> , <i>Tannerellaceae</i> <i>Prevotellaceae</i> ↓ <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> <b>Genres :</b> ↑ <i>Ruminococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Dialister</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Blautia</i> , <i>Parabacteroides</i>	De Filippis et al. <sup>71</sup>

	↓ Bifidobacterium, Bacteroides, Roseburia, Lachnospira, Clostridium, Ruthenibacterium	
Cohorte de 87 enfants (59 sont atteints d'AA et/ou de DA)	<b>Genres :</b> ↑ <i>Lactobacille</i> ↓ <i>Bactéroïdes</i> , <i>Gemelle</i>	Los Rycharska et al. <sup>73</sup>
Cohorte de 141 enfants (66 atteint d'allergie aux œufs)	<b>Genres :</b> ↑ <i>Lachnospiracées</i> , <i>Leuconostocacées</i> , <i>Streptococcacées</i>	Fazlollahi et al. <sup>74</sup>
Cohorte de 166 enfants ayant une sensibilité alimentaire	<b>Phylum :</b> ↓ Bacteroidetes  <b>Familles :</b> ↑ Enterobacteriaceae ↑ Ruminococcaceae, Bacteroidaceae	Azad et al. <sup>75</sup>

AA : allergie alimentaire, DA : Dermatite atopique

### 3.3 Modulation du microbiote intestinal : perspectives et implications cliniques

La comparaison des microbiomes intestinaux des enfants allergiques et non allergiques révèle des différences notables qui pourraient avoir des implications cliniques significatives et suggère une utilité thérapeutique potentielle de la modulation du microbiome intestinal. <sup>69</sup>

Les stratégies potentielles de modulation du microbiome intestinal, lesquelles seront brièvement décrites dans cette section, comprennent l'alimentation, les probiotiques, les prébiotiques, les symbiotiques et la transplantation de microbiote fécal. <sup>69</sup>

## Régimes alimentaires

Les interventions diététiques modifient rapidement la composition du microbiome intestinal en modifiant l'abondance relative des microbes ou en introduisant de nouvelles espèces.

<sup>76</sup> Un régime riche en protéines et graisses animales favorise les *Bacteroides* et la synthèse d'acides biliaires, tandis qu'un régime riche en fibres stimule les *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, augmentant les AGCC qui sont bénéfiques pour l'immunité. <sup>77,78</sup> En effet, les fibres alimentaires protègent contre les maladies inflammatoires et allergiques, en produisant des AGCC anti-inflammatoires qui favorisent les lymphocytes Treg. Toutefois, des études mécanistiques et à long terme sont nécessaires pour comprendre et stabiliser ces effets. <sup>5</sup>

## Probiotiques

Ce sont des micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adaptée pour améliorer la santé intestinale, peuvent contribuer à diminuer l'inflammation liée aux allergies.

<sup>79</sup> Des recherches antérieures ont démontré que l'administration de souches probiotiques telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* modifient la composition du microbiome en renforçant la barrière intestinale, en réduisant la perméabilité intestinale, en stimulant la production d'IgA, et en induisant des cellules Treg, ce qui influence la sensibilité aux allergies alimentaires. <sup>80</sup> Ils favorisent également l'augmentation de l'abondance de bactéries bénéfiques par la production de métabolites protecteurs. <sup>80</sup> Ces probiotiques favorisent également la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) et de dérivés indoliques, qui sont essentiels pour la santé intestinale. Par exemple, des souches spécifiques comme *Lactobacillus plantarum* CCFM1189, *Lactobacillus helveticus* CCFM1190, et *Bifidobacterium longum* CCFM1029 augmentent les populations d'*Akkermansia*, *Faecalibaculum*, et *Dubosiella*, tout en stimulant la production d'acide trans-3-indoleacrylique chez des souris allergiques à l'ovalbumine (OVA). <sup>81</sup> Enfin, *Bifidobacterium longum subsp. infantis* M-63

stimule l'abondance d'*Akkermansia* et de *Ruminococcus* chez les nourrissons souffrant d'allergies au lait de vache, renforçant ainsi les défenses intestinales et la tolérance immunitaire.<sup>82</sup> Ces quelques exemples permettent de comprendre par quels mécanismes les probiotiques pourraient réduire les réactions allergiques associées à un allergène alimentaire.

### **Prébiotiques**

Ce sont des substrats non digestibles qui favorisent la croissance de bactéries bénéfiques.

<sup>83</sup> En tant que substrats de fermentation microbienne, ces prébiotiques ont de multiples fonctions dans l'amélioration de la microflore intestinale basée sur la prolifération sélective de bactéries bénéfiques, l'augmentation de la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, qui renforce la barrière intestinale et module la réponse immunitaire.<sup>84</sup> Une étude a révélé que les prébiotiques sont efficaces pour faire proliférer les bactéries potentiellement bénéfiques (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Roseburia*) et inhiber les bactéries nocives et affecter les métabolites (tels que les AGCC et le tryptophane) pouvant réduire la symptomatologie relative aux allergies alimentaires.<sup>80</sup>

### **Symbiotiques**

C'est une combinaison de micro-organismes vivants et des substrats utilisés par ces micro-organismes.<sup>85,86</sup> La combinaison de probiotiques et de prébiotiques, les symbiotiques, vise à maximiser les effets des deux en encourageant une colonisation bactérienne spécifique tout en fournissant un substrat adapté.<sup>80</sup> Des études montrent que les symbiotiques, comme *Bifidobacterium breve* associé à un mélange d'oligosaccharides, peuvent réduire les symptômes allergiques et favoriser l'équilibre immunitaire par le biais d'une augmentation des cellules Treg qui entraîne une modulation des cytokines.<sup>80</sup>

## Postbiotiques

L'association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques (ISAPP) définit les postbiotiques comme une « préparation de micro-organismes inanimés et/ou de leurs composants conférant un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Cette catégorie inclut des cellules microbiennes inactivées, des lysats bactériens, des exopolysaccharides, des vésicules extracellulaires, des protéines de surface, ainsi que divers métabolites (acides gras à chaîne courte, glucides, enzymes, protéines, acides organiques, lipides, vitamines et molécules complexes).<sup>87</sup> Ils renforcent la barrière intestinale, modulent la réponse immunitaire et apportent des bénéfices similaires aux probiotiques sans les risques d'infection.<sup>80</sup> Actuellement, plusieurs études examinent l'efficacité des postbiotiques dans des modèles animaux d'allergies alimentaires. Par exemple, il a été observé que les vésicules extracellulaires produites par *Bifidobacterium longum* KACC 91563 peuvent se lier spécifiquement aux mastocytes et provoquer leur apoptose, tout en préservant la réponse immunitaire des lymphocytes T.<sup>80</sup>

## Transplantation de microbiote fécal

Il s'agit d'une méthode qui consiste à rétablir l'eubiose intestinale, un état d'équilibre du microbiome caractérisé par une diversité microbienne saine et une fonction optimale.<sup>80</sup> Elle consiste à introduire un microbiome sain et exempt de maladie dans le tractus gastro-intestinal d'une personne ayant une atteinte du tissu intestinal. Dans ce contexte, la composition du microbiome intestinal pourrait être une cible thérapeutique, en transplantant des selles d'un donneur ayant une diversité microbienne intestinale souhaitable.<sup>88</sup> Bien que son utilisation pour les allergies alimentaires soit encore limitée, des études précliniques explorent son potentiel.<sup>80</sup> Feehley et al. ont réalisé une transplantation fécale en transférant le microbiote de nourrissons sans allergie alimentaire documentée et sans risque familiaux à des souris sans germes sensibilisées aux

protéines de lait de vache.<sup>89</sup> Les souris colonisées avec un microbiote de ces nourrissons étaient protégées des réactions anaphylactiques lors d'une exposition à la bêta-lactoglobuline, tandis que celles ayant reçu un microbiote de donneurs souffrant d'allergie au lait de vache ont montré des réponses plus sévères, notamment une diminution importante de la température corporelle et des niveaux élevés d'IgE spécifiques à la bêta-lactoglobuline.<sup>89</sup>

Ces interventions visent à rétablir un microbiote équilibré, riche en bactéries bénéfiques, et à réduire la sensibilité allergique en renforçant la barrière intestinale et en modulant les réponses immunitaires.

### **3.4 Synthèse des études antérieures sur le rôle de l'immunothérapie orale dans la modulation du microbiote intestinal dans les allergies alimentaires**

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans la régulation de l'immunité. Selon les recherches scientifiques, il est désormais bien établi que la perturbation du microbiote, appelée dysbiose, est liée à l'apparition d'allergies alimentaires.<sup>11</sup> Les changements de mode de vie, comme le passage du milieu rural à l'urbain, la transition d'une alimentation riche en fibres à une alimentation plus grasse et riche en protéines, ainsi que le recours de la césarienne ou à l'alimentation au biberon, modifient la composition du microbiote et influencent donc ses effets sur le système immunitaire.<sup>11</sup>

Les communautés microbiennes résidentes dans le corps humain sont plus abondantes que les cellules et gènes de l'hôte humain, d'ailleurs, elles sont aujourd'hui largement étudiées pour



comprendre comment leur déséquilibre pourrait influencer le développement immunologique et donc le risque de maladies allergiques.<sup>90</sup>

Les études sur le microbiome intestinal dans les allergies alimentaires ont donné des résultats très variables, dus à plusieurs facteurs, dont l'hétérogénéité des populations étudiées, les définitions variables de la sensibilisation et de l'allergie alimentaire ainsi que les différences dans le profil méthodologique et les tailles d'échantillon variables des différentes études.<sup>69</sup>

D'ailleurs, les premières recherches portant sur le lien entre le MI et l'AA se sont appuyées sur des techniques de culture bactérienne, ciblant spécifiquement certains groupes bactériens et des espèces d'intérêt pour explorer cette relation.<sup>69</sup> Les méthodes de culture permettent de quantifier certaines bactéries spécifiques, mais sont limitées par les conditions de culture préétablies et le fait que la majorité des bactéries ne sont pas cultivables.<sup>69</sup> Ces approches restreignent donc l'étude de la diversité microbienne. Par exemple, une étude publiée en 2010 par O. C Thompson-Chagoyan et *al.*, menée sur des enfants espagnols présentant une allergie au lait, confirmée par un test cutané (SPT > 3 mm) et une concentration de sIgE  $\geq 0,35$  kU A/L, en plus d'un test de provocation au lait maternisé, a révélé que les nourrissons sensibilisés au lait présentaient une plus grande quantité de bactéries, particulièrement anaérobiques, par rapport aux enfants non allergiques.<sup>91</sup> Après six mois de consommation de différents types de lait maternisé, les nourrissons allergiques au lait ont montré des proportions accrues de lactobacilles, accompagnées de proportions réduites d'entérobactéries et de bifidobactéries dans leurs cultures bactériennes.<sup>91</sup>

Par la suite, grâce aux avancées technologiques, le séquençage du gène de l'ARNr 16S, qui code un composant du ribosome procaryote, a permis une identification bactérienne plus précise.

<sup>92</sup> Ce gène possède des sites de liaison d'amorce hautement conservés et des régions hypervariables

(V1 à V9), qui contiennent des séquences spécifiques permettant de distinguer les différents taxons bactériens, généralement jusqu'au niveau du genre, voire de l'espèce dans certains cas.<sup>92 93</sup> Cette méthode, largement adoptée en microbiologie environnementale et clinique, permet d'analyser la structure taxonomique des communautés bactériennes à partir d'un seul échantillon, sans passer par la culture, ce qui est particulièrement avantageux pour étudier des micro-organismes strictement anaérobies ou non cultivables.<sup>93</sup> L'utilisation d'outils bioinformatiques de nouvelle génération, tels que DADA2, permet une détection fine des variants d'amplicons (ASVs), réduisant le bruit de fond et augmentant la précision taxonomique. De plus, cette approche est compatible avec des bases de données de référence robustes comme SILVA ou Greengenes, et permet des analyses fiables de la diversité alpha (intra-échantillon) et beta (inter-échantillons), essentielles pour évaluer les variations microbiennes entre différents groupes.<sup>93</sup> D'ailleurs, dans une étude menée sur 225 enfants américains, des niveaux plus faibles de bactéries comme *Haemophilus*, *Dialister*, *Dorea* et *Clostridium* entre 3 et 6 mois étaient liés à une sensibilisation à au moins un allergène alimentaire. De plus, des niveaux inférieurs de *Citrobacter*, *Oscillospira*, *Lactococcus* et *Dorea* ont été observés chez les enfants présentant une allergie alimentaire à 3 ans.<sup>94</sup> Une autre recherche canadienne réalisée par Azad MB *et al.*, sur 166 nourrissons a montré qu'une richesse microbienne plus faible à 3 mois augmentait le risque de sensibilisation alimentaire à 12 mois, en revanche, l'augmentation de la diversité microbienne à 3 mois réduisait de 55 % le risque de sensibilisation alimentaire.<sup>95</sup> Chez les nourrissons sensibilisés, les entérobactéries étaient plus présentes et les bactéroïdes moins abondants, suggérant un rôle potentiel de la dysbiose intestinale dans le développement des allergies alimentaires.<sup>95</sup>

Bien que la dysbiose du microbiote intestinal dans les AA et l'immunothérapie orale comme traitement aient été des sujets d'intérêt croissant, l'exploration de leur relation reste limitée. À ce

jour, seules deux études ont examiné cet aspect, à savoir Ziyuan He *et al.*, et Ryohei Shibata *et al.*, qui ont étudié les effets de l'immunothérapie orale sur le microbiome intestinal chez des personnes allergiques.<sup>23,96</sup> Sachant que l'étude menée par Ziyuan He *et al.*, a été menée sur 7 adultes souffrant d'une allergie aux arachides. Par ailleurs, la recherche réalisée par Ryohei Shibata *et al.*, s'est concentré sur 32 écoliers avec une allergie au lait de vache examinant les changements sur les taxons microbiens ainsi que les métabolites.<sup>23,96</sup>

He *et al.* (2020) ont mené une étude auprès d'adultes allergiques aux arachides et traités par OIT pendant 52 semaines. Cette étude a comparé la diversité microbienne avant et après l'ITO, révélant une augmentation de la diversité microbienne  $\alpha$ , y compris des indices de richesse et de diversité de Shannon et de Pielou. À un niveau plus spécifique, huit taxons ont montré des différences significatives après l'OIT : plusieurs espèces de *Clostridia* (dont cinq enrichies) et une espèce de *Bacteroides* étaient plus abondantes, tandis que l'espèce de *Clostridium* (*Clostridium sp chh4-2*) était sous-représentée. Les espèces enrichies appartenaient majoritairement aux familles *Oscillospiraceae*, *Lachnospiraceae*, et *Ruminococcaceae*, qui sont connues pour leurs effets potentiellement tolérants et protecteurs dans le contexte des allergies alimentaires.<sup>96</sup>

De leur côté, Shibata *et al.* (2024) s'est concentrée sur des enfants souffrant d'allergie au lait de vache, traités par immunothérapie orale (OIT) sur une période de 13 mois. Les chercheurs ont observé des changements temporaires dans le microbiote intestinal au début de l'OIT, avec un retour au profil de base à la fin du traitement. Les facteurs associés à une tolérance soutenue incluaient une diminution des niveaux d'IgE spécifiques au lait et à la caséine ainsi qu'une augmentation de la proportion de *Bifidobacterium*. En particulier, les enfants ayant atteint une tolérance soutenue présentaient une augmentation significative des bactéries du

genre *Bifidobacterium*, et des changements dans les modules microbiens incluant les familles *Lachnospiraceae* et des acides gras dans les métabolites intestinaux solubles.<sup>23</sup>

Inspiré par ce champ d'études émergent, notre projet vise à approfondir cette relation afin d'apporter de nouvelles données sur les effets de l'immunothérapie orale dans le contexte des allergies alimentaires.

## CHAPITRE 4 – Impact of oral immunotherapy on diversity of gut microbiota in food-allergic children

Thanina Bouabid, MD <sup>1, 2</sup>, Bénédicte L. Tremblay, PhD <sup>1, 2</sup>, Marie-Ève Lavoie, MSc <sup>1,2</sup>, Anne-Marie Boucher-Lafleur, MSc <sup>1,2</sup>, Frédérique Gagnon-Brassard, RN <sup>1,2</sup>, Philippe Bégin, MD <sup>3</sup>, Sarah Lavoie, MD <sup>2,4</sup>, Cloé Rochefort-Beaudoin, MD <sup>2,4</sup>, Claudia Nuncio-Naud, MD <sup>2,4</sup>, Guy Parizeault, MD <sup>2,4</sup>, Charles Morin, MD <sup>2,4</sup>, Catherine Girard, PhD <sup>1,2</sup>, Anne-Marie Madore, PhD <sup>1, 2</sup>, Catherine Laprise, PhD <sup>1,2,4\*</sup>

1. Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada
2. Centre intersectoriel en santé durable, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada
3. Division d'immunologie clinique, de rhumatologie et d'allergie, Département de pédiatrie, Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, Montréal, Canada.
4. Clinique de recherche Zéro allergie de l'Université du Québec à Chicoutimi et le Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean, Saguenay, QC, Canada.

Corresponding author\*:

Catherine Laprise, Ph.D.

Université du Québec à Chicoutimi

555 Boulevard de l'Université, Saguenay, QC G7H 2B1, Canada

Phone: 418 545-5011 ext. 5659; Fax: 418 615-1203

E-mail: [catherine.laprise@ugac.ca](mailto:catherine.laprise@ugac.ca)

### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflict of interest in relation to this study.

### **Funding**

This work was supported by the Canada Research Chair in Genomics of Asthma and Allergic Diseases (award number CRC-2021-00108), *Fondation de l'UQAC* (<https://fuqac.ca/>) and *Fondation de ma vie* (<https://www.fondationdemavie.qc.ca/>).

## **4.1 Avant-propos**

Cet article a été soumis le 27 janvier 2025 au Pediatric Allergy and Immunology Journal.

Les auteurs tiennent à remercier tous les enfants et leurs familles de la cohorte Zéro allergie qui ont participé à cette étude.

Remerciements : Ce travail a été soutenu par la Chaire de recherche du Canada en génomique de l'asthme et des maladies allergiques, la Fondation de l'UQAC (<https://fuqac.ca/>) et la Fondation de ma vie (<https://www.fondationdemavie.qc.ca/>). CL et BLT font partie du Consortium international sur les allergies alimentaires (InFAC). CL est également membre du réseau AIRS (Air, intersectorialité, recherche respiratoire et sonore du FRQ secteur santé (<https://airs.quebec/>), investigatrice de l'étude CHILD, directrice du Centre intersectoriel en santé durable (CISD) de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC), titulaire de la Chaire de recherche du Canada en génomique de l'asthme et des maladies allergiques (<http://www.chairs.gc.ca>), ainsi que co-titulaire de la Chaire de recherche en santé durable du Québec. BLT est récipiendaire d'une bourse postdoctorale des Instituts de recherche en santé du Canada.

Contributions des auteurs :

TB : Analyse formelle, interprétation des données, visualisation et rédaction de la version initiale du manuscrit. BLT : Rédaction et révision du manuscrit. MEL, AMBL, FGB : Acquisition des données. CL, PB, GP, CM : Conception et mise en œuvre de la clinique de recherche Zéro allergie. SL, CRL, CNN, GP, CM, CG : Évaluation clinique, suivi médical et révision du manuscrit. AMM : Révision des analyses, rédaction et révision du manuscrit. CL : Conception, financement et gestion de la cohorte Zéro allergie et de la clinique de recherche Zéro allergie; conception de l'étude et révision du manuscrit. TB, MEL, AMBL, FGB et AMM font partie de l'équipe de recherche de CL.

## 4.2 Résumé

**Contexte** : Les allergies alimentaires (AA) sont un problème de santé publique croissant, affectant environ 8 % des enfants dans les pays occidentaux. La désensibilisation alimentaire par immunothérapie orale (ITO) est une approche émergente pour traiter ces allergies en augmentant progressivement les doses de l'allergène alimentaire. Par ailleurs, le rôle du microbiote intestinal dans les AA est de plus en plus documenté, notamment sa dysbiose. Peu d'études ont examiné l'impact de l'ITO sur le microbiote intestinal, en particulier chez les enfants. Cette étude vise à évaluer les changements dans la composition et la diversité microbienne chez les enfants avec des AA avant et après l'ITO.

**Méthodes :** L'étude a inclus 30 enfants ayant des allergies alimentaires sous ITO et 7 enfants non allergiques comme contrôles. Des échantillons fécaux ont été prélevés avant (T0) et après (T1) ITO pour les enfants allergiques et une fois pour les contrôles. Le microbiote intestinal a été analysé par séquençage 16S rRNA (région V3-V4). La diversité  $\alpha$  (indices Richness, Chao1, Shannon) et la diversité  $\beta$  (distances Bray-Curtis) ont été comparées, et l'abondance différentielle des bactéries a été évaluée avec ANCOMBC (FDR < 0,05).

**Résultats :** L'analyse de la diversité  $\beta$  a révélé des différences significatives dans la composition microbienne entre les enfants souffrant d'allergies alimentaires avant et après l'immunothérapie orale (PERMANOVA,  $P = 7,60e-03$ ) et entre les contrôles et les enfants souffrant d'allergies alimentaires avant l'immunothérapie orale (PERMANOVA,  $P = 1,0e-04$ ). L'analyse d'abondance différentielle a montré que l'immunothérapie orale entraîne une réversion des niveaux d'abondance de Bacteroidota et Verrucomicrobiota vers ceux observés chez les contrôles.

**Conclusion :** Cette étude est la première à examiner l'impact de l'ITO sur le microbiote intestinal chez des enfants avec différentes allergies alimentaires. Les résultats montrent des changements significatifs dans la composition microbienne après ITO, notamment une réversion partielle des phylums Bacteroidota et Verrucomicrobiota vers les niveaux des contrôles. Ces découvertes contribuent à une meilleure compréhension des effets de l'ITO et peuvent guider au développement de nouvelles approches pour la gestion des AA.

**Mots-clés**

:

Immunothérapie orale, Enfants, Allergie alimentaire, Microbiote intestinal, Bacteroidota, Verrucomicrobiota.

### 4.3 Abstract

**Background:** Food allergies (FAs) are an increasing public health concern, particularly in children. Oral immunotherapy (OIT) is an emerging treatment strategy under clinical investigation for desensitization of children with FA to food allergens. Dysbiosis of the gut microbiota has been implicated in FAs, and various factors influence its composition; however, the impact of OIT on the gut microbiota remains largely unexplored.

**Objective:** This study aimed to identify the changes in diversity of the gut microbiota following OIT in children with FA.

**Methods:** Thirty children with FA undergoing oral immunotherapy and seven non-allergic controls participated in this study. Fecal samples were collected before and after OIT from children with FA, and once from controls. The gut microbiota was profiled using 16S rRNA sequencing, followed by diversity and differential abundance analyses. Alpha and beta diversities were compared, and differential abundance was assessed.

**Results:** Beta diversity analysis revealed small but significant differences in microbial composition between children with FA before and after OIT, and between controls and children with FA before OIT. Differential abundance analysis showed that OIT induced a reversion of the abundance levels of *Bacteroidota* and *Verrucomicrobiota* towards those observed in controls.

**Conclusion:** To our knowledge, this is the first study to investigate the impact of OIT on the gut microbiota in children with different FAs for identifying potential microbial biomarkers and convincingly demonstrated their interrelation. These findings may help improve and personalize FA treatment.



## **Key words**

Oral immunotherapy, Children, Food allergy, Gut microbiota, Bacteroidota, Verrucomicrobiota

## **Abbreviations**

ANOVA - Analysis of variance

CIUSSS - *Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux*

FA - Food allergy

FDR - False discovery rate

OIT - Oral immunotherapy

PCoA - Principal coordinate analysis

PERMANOVA - Permutational multivariate analysis of variance

T0 FA - Timepoint 0, children with food allergy (before oral immunotherapy)

T1 FA - Timepoint 1, children with food allergy (after oral immunotherapy)

ZAC - *Zéro allergie* cohort

## 4.4 Introduction

Food allergies (FAs) are a public health concern, which affect both children and adults, and their prevalence has increased in recent decades <sup>1</sup>. Approximately 8% children in Western countries are affected, 40% of whom are polyallergic <sup>2,3</sup>. Approximately 90% allergic reactions are caused by eight foods: cow milk, eggs, soy, peanuts, tree nuts, wheat, fish, and shellfish <sup>2</sup>. The increasing prevalence of FA is owing to a combination of genetic factors and other intrinsic and environmental factors, including age, eczema, introduction of allergens, breastfeeding, exposure to microorganisms, and alteration of the gut microbiota <sup>4</sup>. The symptomatology of FA varies, ranging from pruritus and urticaria to severe manifestations affecting more than one organ, which may potentially lead to respiratory failure, shock, or death <sup>2</sup>.

FAs can be managed by avoiding allergenic food <sup>1</sup>. This can put allergic individuals at risk of nutritional deficiencies and significantly affects their quality of life <sup>3</sup>. Several studies are underway to develop new therapies for managing FAs. Oral immunotherapy (OIT) involves the consumption of increasing amounts of food allergens to induce desensitization <sup>5</sup>. The initial dose, generally varying between 0.1–25 mg, is gradually increased every one to two weeks until a target maintenance dose is reached. This target dose usually varies between 300–4000 mg, depending on the food, and must be ingested daily to maintain protection for an indefinite period of time <sup>6</sup>. Approximately 80% individuals undergoing OIT achieve complete desensitization; therefore, they can eat a full serving of allergen proteins without developing an allergic reaction while in therapy, and 30–50% of them acquire sustained unresponsiveness, indicating that they can eat a full serving following extended avoidance of exposure to food-allergens <sup>5,7,8</sup>.

The gut microbiota plays a dual role in FA, with a healthy microbiota conferring protection and dysbiosis increasing susceptibility <sup>9–11</sup>. Four bacterial phyla, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*,

*Firmicutes*, and *Bacteroidota*, compose 98% of the gut microbiota<sup>12</sup>. The composition changes with age; the microbiota of newborns is dominated by *Pseudomonadota* (*Escherichia*, *Shigella*) and *Actinomycetota* (*Bifidobacterium*), whereas that of adults is dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidota*<sup>12</sup>. Recent research demonstrates that specific gut microbial profiles are associated with different FA trajectories, including resolution or persistence. Comparative analyses have revealed differences in gut microbiota composition among 128 children with resolved cow's milk allergy and 98 other allergic children, relative to controls<sup>13</sup>. These findings suggest a dynamic role for the gut microbiota in FA resolution. However, critical gaps remain in understanding how microbiota modulation, particularly during OIT, drives FA improvement. To our knowledge, only two studies have evaluated the effects of OIT on gut microbiota. The first one has been conducted on seven adults with peanut allergy, while the second one has focused on 32 school-age children with cow milk allergy, and changes in modules consisting of a combination of microbial taxa and metabolite have been assessed<sup>14,15</sup>.

This severe lack of data leaves multiple questions unresolved, the response patterns of individual microbial taxa to OIT treatment remain unclear, particularly whether certain populations normalize to abundance levels observed in non-allergic individuals. Moreover, the predictive potential of baseline microbiota characteristics for treatment outcomes requires examination. Therefore, this study aimed to identify the changes in microbiota diversity following OIT in children with FA to understand the effects of this treatment on the gut microbiota, thereby potentially leading to a highly personalized approach for optimizing this new treatment strategy.

## 4.5 Methods

### 4.5.1 Study population

Thirty children with FA and undergoing OIT were selected from the Zéro allergie cohort (ZAC) <sup>16</sup>. This cohort was built by recruiting children with FA who followed an OIT at the Zéro allergie research clinic of the Université du Québec à Chicoutimi and the Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) at Saguenay, Canada <sup>16</sup>. Diagnoses of FA were confirmed by a pediatrician based on clinical symptoms and skin prick test (wheal diameter  $\geq 3$  mm of the negative control, measured after 10 min) <sup>17</sup>. Eligible participants had been referred for OIT by their pediatrician and met the inclusion criteria, which included having three or fewer FAs and being available to follow the OIT protocol. Children of all ages (6 months to 17 years), sexes, ethnicities, and FA severities were referred to OIT and were invited to join the ZAC. Those with four or more FAs were excluded. Seven children without FA were included as controls. They were recruited by word-of-mouth, with first-time participants recommending others who met the eligibility criteria (i.e., in the same age group and ethnic background, and with no asthma or allergies). Information on sex, age, premature birth, mode of delivery, breastfeeding, presence of siblings and older siblings, personal and family histories of allergic diseases, and current medications for asthma and eczema were collected using a questionnaire. Family history included father, mother, and siblings. Informed consent was obtained from the legal guardians of all participants. Regarding the 37 participants included in this study, all were Caucasian. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the CIUSSS du SLSJ (project #2022-015). The phenotypic descriptions of children with FA and controls are shown in **Table 4**.

**Table 4.** Baseline characteristics of the children.

	Children with FA (n=30)	Controls (n=7)	P-value
Sex, male:female	1:0.76	1:1.33	0.68
Age, years (mean $\pm$ standard deviation)	3.93 $\pm$ 2.20	2.65 $\pm$ 1.86	0.15
Prematurity <sup>a</sup> , n (%)	3 (10.00)	0 (0.00)	1.00
Cesarean delivery, n (%)	8 (26.67)	3 (42.86)	0.40
Breastfeeding, n (%)	29 (96.67)	5 (71.43)	0.09
Asthma, n (%)	9 (30.00)	0 (0.00)	0.16
Medication for asthma <sup>b</sup> , n (%)	10 (33.33)	0 (0.00)	0.09
Eczema, n (%)	26 (86.67)	0 (0.00)	3.21e-05
Medication for eczema <sup>c</sup> , n (%)	2 (6.67)	0 (0.00)	1.00
Presence of siblings, n (%)	28 (93.33)	5 (71.43)	0.04
Presence of older siblings, n (%)	18 (60.00)	3 (42.86)	0.45
Family history of asthma, n (%)	20 (66.67)	1 (14.29)	0.03
Family history of allergy, n (%)	22 (73.33)	2 (28.57)	0.07
Family history of eczema, n (%)	26 (86.67)	2 (28.57)	4.86e-03

Differences between children with FA and controls were assessed using Fisher's exact test for categorical variables and the Mann–Whitney test for continuous variables.

<sup>a</sup> Prematurity was defined as < 37 weeks of gestation.

<sup>b</sup> Asthma medications included oral corticosteroids, selective beta2-adrenergic receptor agonist (salbutamol), and omalizumab.

<sup>c</sup> Eczema treatment consisted of topical corticosteroids.

#### 4.5.2 Oral immunotherapy (OIT)

All children with FA underwent OIT at the Zéro allergie research clinic. The OIT protocol was optimized based on the 2020 Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology OIT guidelines under the supervision of an allergist<sup>18</sup>. The potential outcomes of OIT include clinical desensitization defined as protection against accidental exposures to food amounts up to the daily dose (protection against traces and cross contamination)<sup>18</sup>. Complete desensitization, refers to the ability to consume the food with no limitation, indicating that they could eat any amount of allergenic food without reaction during therapy<sup>7</sup>. All FA children followed OIT starting at an initial dose ranging from 0.625 to 2.5 mg of total allergen protein. During the build-up phase, the doses were gradually increased every two weeks over three to twelve months, depending on the number of FAs and the

tolerance of the child, until reaching the maintenance dose of 400 mg for 18 months. At the end of this phase, a skin prick test and an oral food challenge, in the case of a borderline skin prick test result ( $\leq 3$  mm after 10 min), are carried out <sup>16</sup>.

#### **4.5.3 Gut microbiota**

Stool samples of the children with FA were collected in an airtight container at home, as close as possible to each medical visit (from one to five days before visit), both before (T0 FA) and after (T1 FA) the updosing phase of OIT ; stool samples were collected on sterile toilet paper folded in aluminum foil only once from the controls <sup>19</sup>. Stool samples from children with FAs were collected before the recruitment of controls, explaining the change in the sampling method following protocol optimization. Stool samples were frozen until next visit to the clinic, when they were placed in an insulated bag. All samples were analyzed in replicate for each participant.

#### **4.5.4 DNA extraction and sequencing**

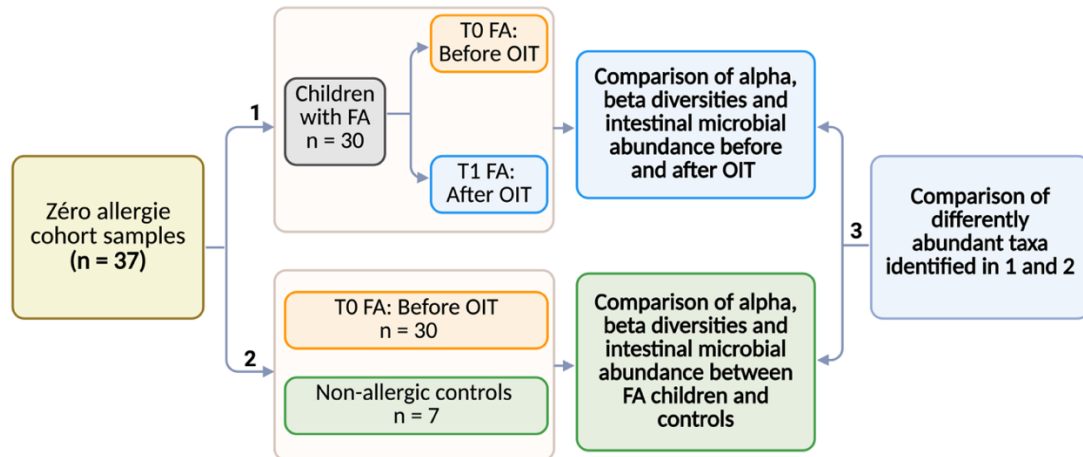
Microbial DNA was extracted using a DNeasy Powersoil Pro Kit (Qiagen, ON, Canada), following the manufacturer's instructions, and stored at -80 °C. DNA concentration was measured using a Qubit 4.0 fluorimeter with a Broad Range Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and purity was assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Samples were diluted at 10 ng/uL concentration. The hypervariable region of the 16S ribosomal RNA gene was sequenced at the Institute of Integrative Biology and Systems (Université Laval, Quebec, Canada). To target the V3-V4-specific regions, a two-step amplification technique was used with dedicated primers for the sense strands 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and antisense strands

805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Sequencing was performed using a MiSeq equipment (Illumina, San Diego, CA, USA) that produced 300-bp paired-end sequences.

#### 4.5.5 Statistical analyses

Statistical analysis was performed using R v.4.3.2 <sup>20</sup>. The filterAndTrim function of DADA2 package v.1.30.0 <sup>21</sup> was used for qualitative sorting, filtering (minimum length of 265 and 225 bp for forward and reverse sequences, respectively), and trimming (removal of 20 and 21 bp for forward and reverse sequences, respectively). Sequences with more than two or five errors (forward and reverse sequences, respectively) and with a quality score lower than two were excluded. Chimeric sequences were removed using removeBimeraDenovo function in DADA2 package <sup>21</sup>. Taxonomy was assigned to nonchimeric sequences using the SILVA reference database v.138.1. All data were integrated into a phyloseq object <sup>22</sup>. To filter taxa with nonsignificant contributions or contaminants, a covariance-based filtering method from the PERfect package v.1.16.0 <sup>23</sup> was used.

**Fig 5** presents the study design, with all the analyses and comparisons performed between the phenotypic groups. The same analyses were conducted for two types of comparisons: between groups of children with FA before (T0 FA) and after (T1 FA) OIT, and between controls and children with FA before OIT (T0 FA). Replicates of all samples were included in this study. Technical replicates were included for all samples to account for intra-individual variability and variability introduced during sample processing steps.



**Figure 5.** Schematic of the study design. The analysis steps include comparisons of alpha and beta diversities and identification of intestinal microbial taxa with differential abundance **(1)** between children with FA before (T0 FA) and after (T1 FA) the up dosing phase of oral immunotherapy and **(2)** between controls and the T0 FA group. Finally, **(3)** comparisons were made between differently abundant taxa identified in the two previous comparisons for assessing if OIT induces a reversion of certain taxa to normal abundance levels. The figure is generated using BioRender.com.

Alpha diversity between the T0 FA and T1 FA groups, or between the control and T0 FA groups was calculated using MicrobiomeStat package (v.1.2.1 <https://CRAN.R-project.org/package=MicrobiomeStat>), based on the richness, Chao1, evenness, and Shannon indices. Graphs were generated directly through MicrobiomeStat's visualization functions. A linear model was subsequently performed to compare alpha diversity between groups ( $p < 0.05$ ). A mixed model considering paired samples was used for the T0 FA and T1 FA groups and sex, age, number of food allergens, and duration of OIT treatment were considered as covariates. A multiple linear model was used for the control and T0 FA groups comparison using sex and age as covariates.

The diversity between communities (beta) was evaluated using vegan package <sup>24</sup>. Normalized data using the relative log expression method implemented in edgeR package v.4.0.16 <sup>26</sup> were used to calculate the Bray–Curtis dissimilarities between the samples of the T0 FA and T1 FA groups and between the control and T0 FA groups. Principal coordinate analysis (PCoA) was used to visualize Bray–Curtis dissimilarity matrices. A beta dispersion test (betadisper) and permutations



(permutest; 9,999 permutations and  $p$ -value cut-off of 0.05) from vegan package <sup>24</sup> were used to check the homogeneity of variances between the groups and sample replicates. Permutation patterns were used to compare paired samples (T0 FA and T1 FA groups) and replicates (T0 FA vs. T1 FA and controls vs. T0 FA). Following this, permutation multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed using adonis2 function of the same package with 9,999 permutations using the same permutation pattern ( $p < 0.05$ ), while maintaining identical variable adjustments as in the linear models for alpha diversity.

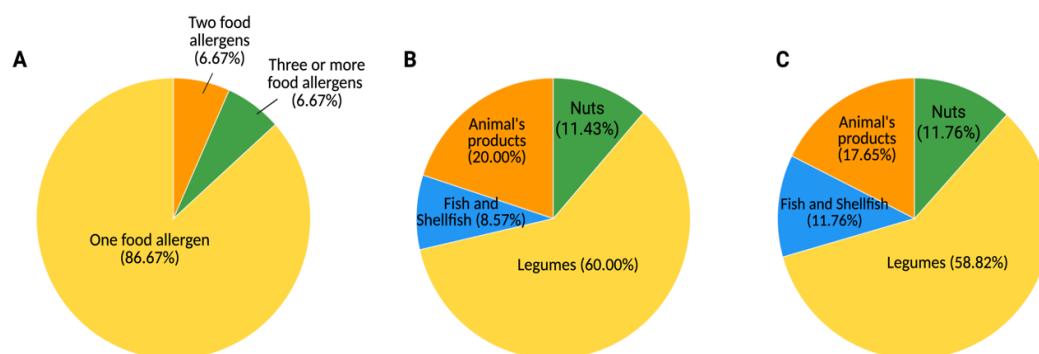
Differences in bacterial abundance between groups were determined using analysis of differential abundance and correlation analyses with bias correction (ANCOMBC package v.2.4.0) <sup>27</sup>. The Benjamini–Hochberg method of false discovery rate (FDR) was used to obtain the adjusted  $p$ -values considering multiple comparisons ( $FDR < 0.05$ ). For comparison between the T0 FA and T1 FA groups, paired samples were considered by including them as random variables, whereas the fixed variables for both comparisons were previously mentioned in the analysis of alpha diversity description above. Genera and phyla were analyzed. Bar plots were generated using ggplot2 library <sup>25</sup>. Differences between the three groups (controls, T0 FA and T1 FA) for significant results from the ANCOM-BC analyses were illustrated using bar plots. Significance threshold was adjusted by Bonferroni correction to account for multiple pairwise comparisons between abundance levels from the same taxa, applied to the raw  $p$  values from ANCOM-BC analyses ( $\alpha = 0.0167$ , considering three comparisons).

## 4.6 Results

### 4.6.1 Participant characteristics

The characteristics of children with FA and controls are presented in Table 4. No significant differences were observed between the children with FA and control group regarding age, sex, prematurity, mode of delivery, and breastfeeding status. Personal histories of eczema and family histories of asthma, allergy, and eczema were more frequent in children with FA than in the controls. Personal history of asthma was observed only in children with FA; however, the difference was not significant.

**Fig 6** presents the FA profiles of children with allergies, including the frequency related to the number of food allergens, types of food allergens targeted, and allergens targeted by desensitization. Most children with allergies (86.67%) had one FA; 6.67% had two FAs; and 6.67% had three or more FAs. Legumes (60.00%) were the most common food allergen, whereas fish and shellfish were least common (8.57%). Two children were desensitized to two allergens, while one child was desensitized to three allergens.



**Figure 6.** Description of FA profile among allergic children. **(A)** The frequency related to the number of food allergens leading to allergic reaction for each child. **(B)** Types of food allergens in allergic children. **(C)** Food

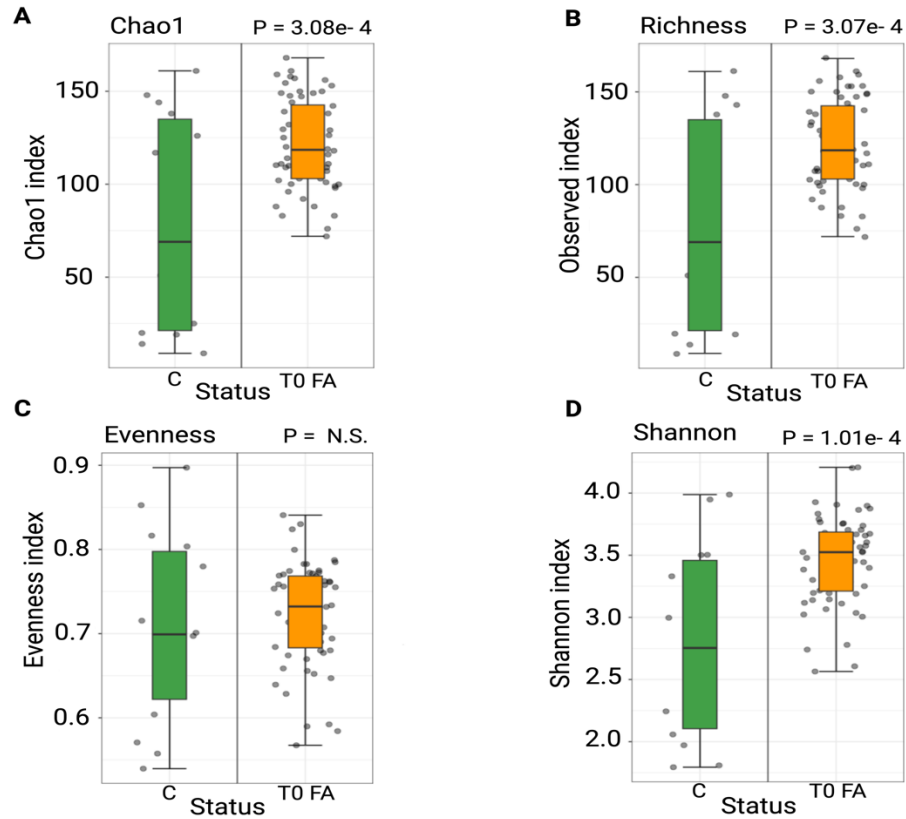
allergens targeted by desensitization in allergic children. (Nuts - cashews, hazelnuts, and pistachios; legumes - lentils, peanuts, and peas; Animal products - egg, milk). The figure is generated using BioRender.com.

#### **4.6.2 Oral immunotherapy (OIT)**

The mean duration of the updosing phase of OIT was  $215.90 \pm 68.65$  days. Among the 30 allergic children, 14 (46.67%) reached complete desensitization. Moreover, 13 children (43.33%) attained clinical desensitization, which persisted throughout the maintenance phase. These children still avoided consuming the allergen through diet; however, they tolerated traces and were no longer at the risk of severe reactions following accidental exposures <sup>18</sup>. Finally, three children (10.00%) reached complete clinical remission for one of the allergens; therefore, they could consume this allergen *ad libitum* <sup>28</sup>, and continued the maintenance phase for the other allergens.

#### **4.6.3 Alpha diversity**

Alpha diversity of the microbiota was compared between the T0 FA and T1 FA groups. None of the measures tested were significant (Supplementary Fig 10). Alpha diversity was significantly different between the control and T0 FA groups for Chao1, richness, and Shannon indices, but not for evenness. Notably, although the Shannon index also incorporates evenness, it still showed significant differences between the groups. The evenness index measures the equal abundances of different taxa within a sample <sup>29</sup> (**Fig 7**).



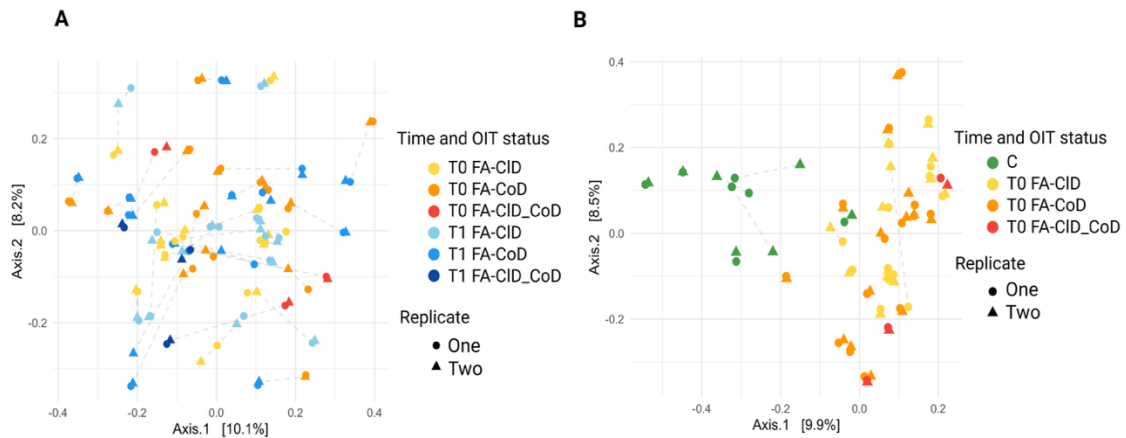
**Figure 7.** Alpha diversity between controls (C, green) and children with FA before oral immunotherapy (T0 FA, orange) measured by (A) observed index, (B) Chao1 index, (C) evenness index, and (D) Shannon index. Boxes represent quartiles, illustrating the largest distribution of both sample groups, with the line showing the median. The  $p$ -values were calculated using ANOVA ( $p < 0.05$ ). Three out of four alpha diversity metrics showed significant differences, while evenness (C) was non-significant (N.S.), as indicated in the figure.

#### 4.6.4 Beta diversity between allergic children before and after OIT

PCoA was performed to assess the similarity of the samples with respect to their replicates (Fig 8A). The group of FA children was divided into three subgroups: complete desensitization (CoD), clinical desensitization (CID), and children who achieved clinical desensitization for one allergen and complete desensitization for the other (CID\_CoD). To validate the results, a beta dispersion test was used to assess their homogeneity of variance. Homogeneity of variance between replicates was

observed for samples from the T0 FA and T1 FA groups ( $p = 6.04e-01$ ; **Supplementary Fig 11A, 11A**).

Therefore, the replicates were included in all analyses.



**Figure 8.** Plots showing Bray–Curtis dissimilarity in (PCoA) space for samples of **(A)** children with FA before and after the updosing phase of OIT and **(B)** children with FA before OIT and controls. Three different shades of orange, from lightest to darkest, represent children with FA before OIT (T0 FA): light orange for those who reached complete desensitization (CoD), medium orange for clinical desensitization (CID), and dark orange to represent children who achieved clinical desensitization for one allergen and complete desensitization for the other (CID\_CoD). Three different shades of blue, from lightest to darkest, represent children with FA after OIT (T1 FA) with the same clinical categories. Green circles represent controls (C). Triangles of the same colors represent their replicates. Gray connecting lines link paired T0-T1 samples from the same subject in panel A and connect samples to their technical replicates in both panels.

According to the beta dispersion test between samples from the T0 FA and T1 FA groups, these had heterogenous variance ( $p = 7.00e-03$ ; **Supplementary Fig 11B, 11B**). To quantify the differences in microbial community composition, a PERMANOVA revealed a small but significant difference in community patterns between T0 FA and T1 FA groups ( $p = 7.60e-03$ ,  $R^2 = 0.02622$ ). Based on the dispersion results, this difference in composition of the microbial communities was mostly owing to variance heterogeneity between the samples of the two groups.

#### 4.6.5 Beta diversity in controls and allergic children before OIT

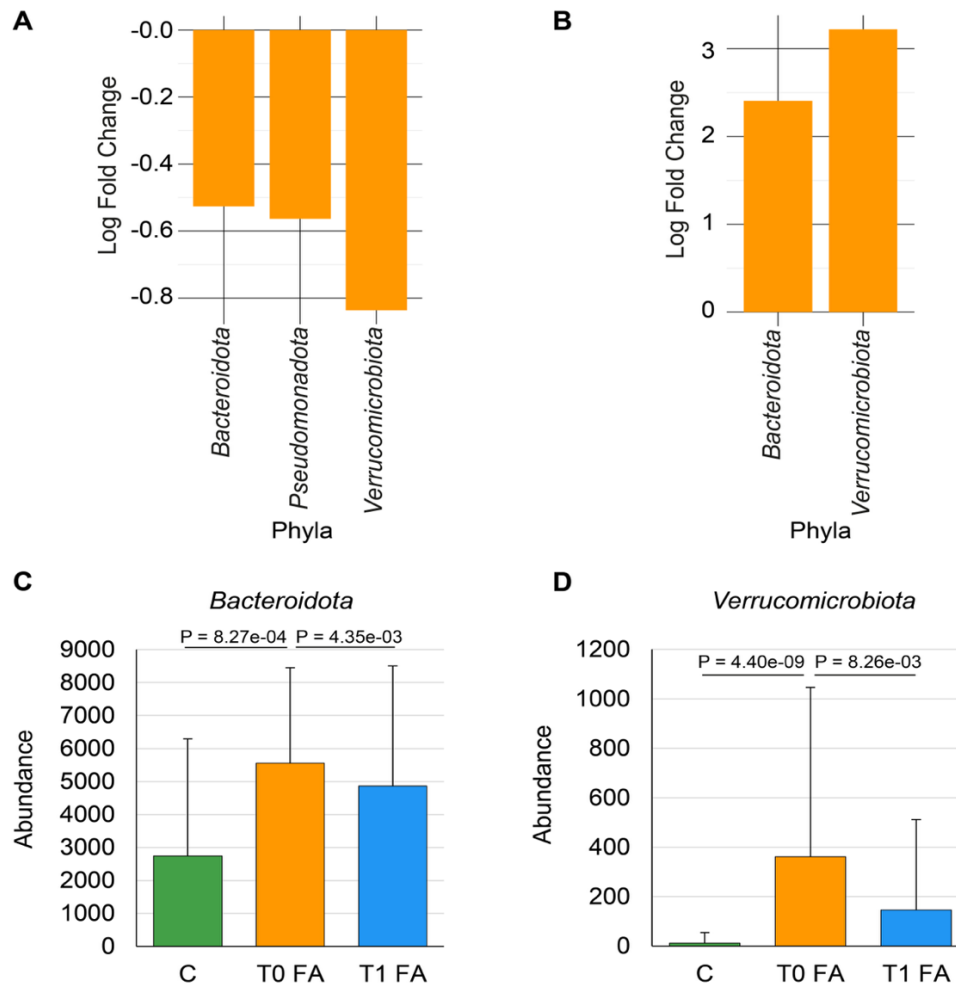
PCoA was conducted to evaluate the similarity of the samples with respect to their replicates in samples from the control and T0 FA groups, which confirmed their similarity (**Fig 8B**). The beta dispersion test demonstrated replicate homogeneity for these samples ( $p = 8.58e-01$ ). Both results justified their inclusion in downstream analyses (**Supplementary Fig 11C, 11C**).

Moreover, the beta dispersion test between the control and T0 FA groups revealed heterogeneity between the samples from these groups ( $p = 8.10e-03$ ). Significant differences in the composition of microbial communities were noticed between the controls and children with FA before OIT ( $p = 1.00e-04$ ,  $R^2 = 0.17451$ ). Based on the dispersion results, this difference was partly owing to variance heterogeneity between the groups. However, the distance between the centroids of the control and T0 FA groups (**Supplementary Fig 11D, 11D**) combined with the high resistance of adonis2 algorithm to non-homogeneity of variance between groups highlights a small difference in composition between the two microbial communities.

#### 4.6.6 Differential abundances

Three bacterial phyla, *Bacteroidota*, *Pseudomonadota*, and *Verrucomicrobiota*, were identified as being less abundant in the T1 FA group than in the T0 FA group (**Fig 9A**) considering an FDR-adjusted  $p$ -value  $< 0.05$ . Two bacterial phyla, *Bacteroidota* and *Verrucomicrobiota*, were found to be less abundant in the control group than in the T0 FA group (**Fig 9B**). No bacterial genera were found to be significantly more or less abundant between the T0 FA and T1 FA groups, based on an FDR-adjusted  $p$ -value  $< 0.05$ . However, 19 bacterial genera were more abundant in the T0 FA group,

whereas 11 others were more abundant in the control group. The significant results for all genera are shown in **Supplementary Table 5**.



**Figure 9.** Phyla with significant differences in abundance levels. **(A)** Barplots showing significant log (fold changes) (LFC; y-axis) by bacterial phyla (x-axis) generated using ANCOM-BC test with significance threshold set to false discovery rate (FDR) < 0.05 for the comparison between allergic children before (T0 FA) and after (T1 FA) the updosing phase of the OIT groups. Orange bars represent the bacterial phyla more abundant in the T0 FA group than in the T1 FA group (negative LFC values). **(B)** Significant LFCs of bacterial phyla between the control and T0 FA groups. Orange bars represent bacterial phyla more abundant in the T0 FA group than in the control group (positive LFC values). **(C)** Abundance of the phylum Bacteroidota across the three groups: controls (C), T0 FA, and T1 FA. **(D)** Abundance of the phylum Verrucomicrobiota across the three groups: C, T0 FA, and T1 FA. The p-values for **C** and **D** were derived from ANCOM-BC analyses with Bonferroni correction for significance threshold ( $\alpha = 0.0167$  for 3 comparisons).

The bacterial phyla *Bacteroidota* and *Verrucomicrobiota* were significantly less abundant in the T1 FA group than in the T0 FA group ( $p = 4.35\text{e-}03$  and  $8.26\text{e-}03$ , respectively; **Fig 9C, D**), and in the control group than in the T0 FA group ( $p = 8.27\text{e-}04$  and  $4.40\text{e-}09$ , respectively; **Fig 9C, D**). This suggests that OIT may normalize the abundance of these phyla, bringing their levels close to those observed in control group. Interestingly, although not all results were significant, a tendency towards reversion was observed for all five identified phyla (**Supplementary Table 6**).

## 4.7 Discussion

This study aimed to explore the gut microbial composition and diversity before and after OIT in children with FA, and between children with FA and controls. Alterations in the intestinal microbiota are linked to FA development. Several studies have reported differences in intestinal microbial composition and diversity between individuals with FA and controls<sup>10,13,30-32</sup>. However, only two studies have examined differences in the gut microbiome after OIT<sup>14,15</sup>. In this study, the analytical design allowed the assessment of changes induced by OIT in the gut microbiota of children with FA, and the observed changes in the microbiota were compared with those of control individuals, thereby providing an important advantage to interpret the changes.

Regarding alpha diversity, no significant difference was noted when comparing children with allergies before and after the updosing phase of OIT. Furthermore, the difference in alpha diversity between the control and T0 FA groups was significant, except for the evenness index. Richness, Chao1, and Shannon indices were higher in children with allergies than in controls, indicating a relatively high estimated diversity in the number and abundance of species in children with allergies. However, the results of gut microbial alpha diversity in the literature are contradictory. Several



studies have reported higher gut microbial diversity in controls than in children with FA <sup>33,34</sup> while others have reported the opposite result <sup>30,34</sup> or no significant difference <sup>10,35</sup>.

Beta diversity analysis revealed a small but significant difference between the T0 FA and T1 FA groups, which highlighted a change in the intestinal microbial composition after the up dosing phase of OIT. This has also been previously observed in adults with peanut allergy undergoing OIT <sup>14</sup>. However, the results indicated that changes in the intestinal microbial composition following OIT may be significantly influenced by the heterogeneity of the microbial variance in samples of the two groups. A comparison between the controls and children with FA before OIT also revealed a significant difference in beta diversity, indicating a distinct microbial composition between the two groups. This reinforces the findings of previous studies showing that children with FA possess a gut microbiota distinct from that of the controls <sup>30,36</sup>.

At the genus level, no significant differences were observed between children with allergies before and after OIT. However, 11 bacterial genera were enriched in the control group compared to those in the allergic children before OIT. Similar results have been previously observed for seven of these genera (*Romboutsia*, *Megamonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Eggerthella*, *Escherichia/Shigella*, *Blautia*, *Streptococcus*) <sup>33,37-39</sup>. Nineteen bacterial genera were also found to be enriched in children with allergies before OIT compared to those in the control group, with five being associated with FA (*Parasutterella*, *Lachnospira*, *Sutterella*, *[Eubacterium] siraeum* group, *[Eubacterium] oxidoreducens* group), as previously reported <sup>34,40-43</sup>.

Changes in phylum abundance may be relatively hard to interpret because of the numerous genera that compose them; however, it can still provide information on the general impact of OIT on diversity of the microbiota. Although all results were not significant, the tendency of all five phyla

to revert towards the control levels after OIT was very promising. Some results showed the attainment of the significance threshold. Two phyla, *Bacteroidota* and *Verrucomicrobiota*, were less abundant in children following OIT than that before treatment. These bacterial phyla were also less abundant in the controls than in the children before OIT. *Verrucomicrobiota* is more abundant in children with egg allergy than in nonallergic children <sup>30</sup>. Furthermore, a study on toddlers allergic to cow milk protein has shown an increased abundance of the phylum *Bacteroidota* compared to that in healthy individuals <sup>44</sup>. Both studies have validated the observed differences between the children with FA and controls in this study; however, our study is the first to document the reversion of their abundance after OIT. Moreover, the *Verrucomicrobiota* phylum is also known to be more predominant in individuals with eczema compared to healthy controls <sup>45</sup>. Eczema in first year of life is an important risk factor for developing FA as it is the first step to the atopic march, a phenomenon where children who develop moderate-to-severe eczema in their first year has 35% to 75% more risk to develop FA, allergic asthma and allergic rhinitis later in life <sup>3,46</sup>.

The bacterial phylum *Pseudomonadota* was also found to be more abundant in allergic children before OIT than in children after OIT; however, the comparison between the control group and children with FA was not significant. A previous study has also identified this phylum as being significantly higher in the breast milk of mothers of infants with FA than in the controls <sup>33</sup>, which is consistent with the results obtained in this study.

Reversion to normal abundance levels was not observed in genus analysis. This could be partly explained by the use of 16S rRNA gene-targeted sequencing rather than whole metagenomic sequencing. While this approach is useful for bacterial classification, it has limited phylogenetic resolution at the species level and reduced discriminatory potential for some genera <sup>47</sup>. Moreover, a relatively large cohort may have potentially led to the identification of high number of genera or each genus in increased number of samples, thereby increasing the analytical potential at this taxon

level. However, this study included samples from children with FAs similar in number with that of other published reports <sup>34,37</sup>. Notably, the two studies that considered the impact of OIT on the gut microbiome were conducted involving seven adults and 32 school-age children, respectively <sup>14,15</sup>.

The main strength of this study is its novel design, as it assessed the differences in composition of the gut microbiota following OIT in children with different FAs and included a control group for further comparison. This design has some limitations, including the small number of controls (n = 7), which reflects the challenge of recruiting nonallergic children, and the difference in methodology between the children with FAs and controls owing to evolving laboratory protocols over time. Additionally, while this analysis does not account for different sensitizations owing to constraints in sample size, future work should address this issue by considering the impact of specific sensitizations on the observed outcomes. However, this design validated previously reported results for children with FAs and controls and assessed an acceptable level of confidence if OIT induces a possible reversion of certain taxa towards the abundance levels observed in controls. This provides a considerable understanding of the effects of OIT and may potentially help improve this new treatment strategy. Incorporating probiotics into therapeutic strategies according to the microbiota profile of patients shows potential for modulating the gut microbiota and improving FA management <sup>48</sup>. In summary, the insights of this study are important to improve and personalize the management of FAs.

## **4.8 Acknowledgements**

The authors are grateful to all the children and their families of the *Zéro allergie* cohort who participated in this study.

## 4.9 References

1. Seth, D., Poowutikul, P., Pansare, M. & Kamat, D. Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann* **49**, e50-e58 (2020).
2. Cosme-Blanco, W., Arroyo-Flores, E. & Ale, H. Food Allergies. *Pediatr Rev* **41**, 403-415 (2020).
3. Peters, R.L., Krawiec, M., Koplin, J.J. & Santos, A.F. Update on food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* **32**, 647-657 (2021).
4. Cheng, Y. *et al.* The Roles and Mechanisms of Gut Microbiota in Food Allergy. *Advanced Gut & Microbiome Research* **2023**, 1-16 (2023).
5. Kazmi, W. & Berin, M.C. Oral tolerance and oral immunotherapy for food allergy: Evidence for common mechanisms? *Cell Immunol* **383**, 104650 (2023).
6. Wood, R.A. Oral Immunotherapy for Food Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* **27**, 151-159 (2017).
7. Pajno, G.B. *et al.* EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. *Allergy* **73**, 799-815 (2018).
8. Nurmatov, U. *et al.* Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* **72**, 1133-1147 (2017).
9. Leone, L., Mazzocchi, A., Maffei, L., De Cosmi, V. & Agostoni, C. Nutritional management of food allergies: Prevention and treatment. *Front Allergy* **3**, 1083669 (2022).
10. Ling, Z. *et al.* Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2546-54 (2014).
11. Goldberg, M.R. *et al.* Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Medicine* **12**, 1-18 (2020).
12. Dubuc-Fortin, E., Marquis, M. & Scuralli, S. Prévalence, facteurs de risque et conséquences des allergies alimentaires chez les enfants d'âge scolaire. *Nutrition Science en évolution* **18**, 9-15 (2020).
13. Bunyavanich, S. *et al.* Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 1122-1130 (2016).
14. He, Z. *et al.* Increased diversity of gut microbiota during active oral immunotherapy in peanut-allergic adults. *Allergy* **76**, 927-930 (2021).

15. Shibata, R. *et al.* Gut microbiota and fecal metabolites in sustained unresponsiveness by oral immunotherapy in school-age children with cow's milk allergy. *Allergology International* **73**, 126-136 (2024).
16. Tremblay, B.L. *et al.* Zéro allergie research clinic: a clinical and research initiative in oral immunotherapy for managing IgE-mediated food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* **20**, 59 (2024).
17. Heinzerling, L. *et al.* The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy* **3**, 3 (2013).
18. Begin, P. *et al.* CSACI guidelines for the ethical, evidence-based and patient-oriented clinical practice of oral immunotherapy in IgE-mediated food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* **16**, 20 (2020).
19. Dubois, G., Girard, C., Lapointe, F.-J. & Shapiro, B.J. The Inuit gut microbiome is dynamic over time and shaped by traditional foods. *Microbiome* **5**, 151 (2017).
20. Allaire, J. RStudio: Integrated Development Environment for R. (RStudio, PBC, Boston, MA, 2012).
21. Callahan, B.J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* **13**, 581-3 (2016).
22. McMurdie, P.J. & Holmes, S. Phyloseq: a bioconductor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. *Pac Symp Biocomput*, 235-46 (2012).
23. Smirnova, E., Huzurbazar, S. & Jafari, F. PERFect: PERmutation Filtering test for microbiome data. *Biostatistics* **20**, 615-631 (2019).
24. Oksanen, J. *et al.* Package 'vegan'. *Community ecology package, version 2*, 1-295 (2013).
25. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-40 (2010).
26. Lin, H. & Peddada, S.D. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun* **11**, 3514 (2020).
27. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.*, (Springer-Verlag, 2016).
28. Jones, S.M. *et al.* Efficacy and safety of oral immunotherapy in children aged 1-3 years with peanut allergy (the Immune Tolerance Network IMPACT trial): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* **399**, 359-371 (2022).
29. Hagerty, S.L., Hutchison, K.E., Lowry, C.A. & Bryan, A.D. An empirically derived method for measuring human gut microbiome alpha diversity: Demonstrated utility in predicting health-related outcomes among a human clinical sample. *PLoS One* **15**, e0229204 (2020).
30. Fazlollahi, M. *et al.* Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* **73**, 1515-1524 (2018).

31. Goldberg, M.R. *et al.* Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Med* **12**, 92 (2020).
32. Goldberg, A. *et al.* Distinctive Gut Microbiota Signature in Persistent IgE-mediated Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, AB189 (2019).
33. Wang, S., Wei, Y., Liu, L. & Li, Z. Association between breastmilk microbiota and food allergy in infants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, 770913 (2022).
34. Lee, K.H. *et al.* Dysfunctional Gut Microbiome Networks in Childhood IgE-Mediated Food Allergy. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 2079 (2021).
35. Savage, J.H. *et al.* A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* **73**, 145-152 (2018).
36. Hara, M. *et al.* Gut microbiota of one-and-a-half-year-old food-allergic and healthy children. *Allergology International* (2024).
37. Kanchongkittiphon, W. *et al.* Characterization of gut microbiome profile in children with confirmed wheat allergy. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 000-000 (2024).
38. Davis, E.C., Jackson, C.M., Ting, T., Harizaj, A. & Järvinen, K.M. Predictors and biomarkers of food allergy and sensitization in early childhood. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **129**, 292-300 (2022).
39. Wang, S. *et al.* Relationship between maternal–infant gut microbiota and infant food allergy. *Frontiers in Microbiology* **13**, 933152 (2022).
40. Rachid, R.A. *et al.* Food allergy in infancy is associated with dysbiosis of the intestinal microbiota. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, AB235 (2016).
41. Abbring, S. *et al.* Raw milk-induced protection against food allergic symptoms in mice is accompanied by shifts in microbial community structure. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3417 (2021).
42. Inoue, R. *et al.* A preliminary study of gut dysbiosis in children with food allergy. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **81**, 2396-2399 (2017).
43. Zhu, Z., Hu, C., Liu, Y., Wang, F. & Zhu, B. Inulin has a beneficial effect by modulating the intestinal microbiome in a BALB/c mouse model. *Beneficial Microbes* **14**, 371-383 (2023).
44. Xiong, J. *et al.* Alterations of the gut microbiota and short chain fatty acids in necrotizing enterocolitis and food protein-induced allergic proctocolitis infants: A prospective cohort study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, 1030588 (2022).
45. Zeng, Y. *et al.* Characteristics of gut microbiota and serum metabolism in patients with atopic dermatitis. *Skin Res Technol* **30**, e13792 (2024).

46. Carlsten, C. *et al.* Atopic dermatitis in a high-risk cohort: natural history, associated allergic outcomes, and risk factors. *Ann Allergy Asthma Immunol* **110**, 24-8 (2013).
47. Janda, J.M. & Abbott, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**, 2761-4 (2007).
48. Di Costanzo, M. *et al.* Probiotics in Infancy and Childhood for Food Allergy Prevention and Treatment. *Nutrients* **16**(2024).

## DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude était d'examiner la composition et la diversité du microbiote intestinal (MI) avant et après l'immunothérapie orale (ITO) chez des enfants atteints d'allergies alimentaires (AA), et de comparer ces résultats à ceux de contrôles non allergiques. Plusieurs études ont rapporté que l'altération du MI est associée au risque de développer une AA . D'ailleurs de nombreuses études ont mis en évidence les différences de composition et la diversité microbienne intestinale ainsi que de l'abondance entre les enfants allergiques et les témoins non allergiques. <sup>19,20,74,97,98</sup> Également, une diminution de la diversité microbienne, fréquente chez les individus allergiques, est associée à une réduction des Treg, suggérant que restaurer cette diversité pourrait être une stratégie prometteuse pour prévenir ou traiter les AA. <sup>49</sup>

Ainsi, des études cliniques récentes ont démontré que l'ITO peut être utilisée de manière sûre et efficace pour réduire la sensibilité aux antigènes alimentaires chez les personnes atteintes AA. <sup>8</sup>

Cependant, les mécanismes par lesquels les patients développent une désensibilisation – définie comme l'absence de réactivité clinique à l'antigène – restent encore mal compris. <sup>8</sup> La modulation du MI a été suggérée comme une approche complémentaire à l'ITO, visant à en renforcer la sécurité et l'efficacité. <sup>99</sup>

À ce jour, seulement deux études ont évalué l'effet de l'ITO sur les changements du microbiome intestinal. <sup>22,23</sup> La première étude a été réalisée chez sept adultes atteints d'allergie à l'arachide recevant de la farine d'arachide et 2 recevant un placebo (farine d'avoine) dans une étude randomisée, en double aveugle sur des échantillons prélevés avant et après 52 semaines d'ITO. <sup>22</sup>

Tandis que la seconde s'est concentrée sur 32 enfants d'âge scolaire souffrant d'allergie au lait de vache, en examinant les changements au niveau des taxons microbiens et des métabolites. <sup>23</sup>



Dans le cadre de l'étude réalisée pour ce mémoire, l'analyse de la diversité  $\alpha$  réalisée n'a mis en évidence aucune différence significative entre les enfants allergiques avant et après la phase d'augmentation des doses d'ITO. En revanche, une différence significative a été constatée entre les témoins non allergiques et les enfants allergiques avant l'ITO, à l'exception de l'indice d'uniformité. Les indices de diversité tels que Chao1 et Shannon étaient nettement plus élevés chez les enfants allergiques comparés aux non allergiques, reflétant une richesse et une abondance estimées supérieures en termes d'espèces microbiennes dans le microbiote intestinal des enfants allergiques.

Cependant, les résultats sur la diversité  $\alpha$  dans la littérature sont contradictoires. Les études de Fazlollahi *et al.*, et de Lee *et al.*, ont montré que la diversité microbienne intestinale pourrait être plus élevée chez les enfants allergiques par rapport aux non allergiques.<sup>74,100</sup> D'autres études n'ont également rapporté aucune association entre la diversité du MI et l'AA.<sup>20,72</sup> Ling *et al.*, (2014) ont analysé la diversité  $\alpha$  du microbiote fécal chez des nourrissons atteints d'AA comparativement à la diversité de personnes sans allergie, en utilisant les indices de Shannon et Simpson.<sup>20</sup> Bien que l'indice de Shannon ait été légèrement plus faible et celui de Simpson légèrement plus élevé dans le groupe ayant des AA, ces différences n'étaient pas statistiquement significatives.<sup>20</sup> L'analyse de raréfaction a montré une richesse en espèces comparable entre les deux groupes, suggérant que la diversité  $\alpha$  seule ne permet pas de différencier clairement les nourrissons allergiques des contrôles.<sup>20</sup> À l'inverse, certaines études ont rapporté une diversité  $\alpha$  plus élevée chez les contrôles non allergiques par rapport aux enfants allergiques.<sup>100,101</sup> Par conséquent, il a été suggéré que le rôle du MI dans l'AA devrait être envisagé en tenant compte de l'interaction entre les différents taxons et de leurs effets métaboliques, plutôt qu'en examinant uniquement une dimension, comme la

diversité microbienne.<sup>100</sup> Cela pourrait également être dû à la différence dans le nombre d'échantillons entre les contrôles non allergiques (n=7) et les enfants allergiques (n=30).

L'analyse de la diversité  $\beta$ , quantifiée dans la présente étude, a révélé une différence significative bien que modeste entre les deux groupes allergiques, soulignant une modification de la composition microbienne intestinale après la phase d'augmentation des doses d'ITO. Ce résultat corrobore les observations d'une étude antérieure portant sur sept adultes allergiques à l'arachide ayant suivi une ITO pendant 52 semaines.<sup>96</sup> Par ailleurs, ces résultats montrent que les changements dans la composition microbienne intestinale après ITO peuvent être fortement influencés par l'hétérogénéité de la variance du microbiote entre les échantillons des deux groupes. La comparaison entre les personnes sans allergie et les enfants allergiques avant ITO a également montré une différence significative en termes de diversité  $\beta$ , indiquant une composition microbienne distincte entre les deux groupes. Cela renforce les résultats d'études rapportées dans la littérature scientifique selon lesquels les enfants allergiques présentent un microbiote intestinal distinct des contrôles non allergiques.<sup>74,102</sup> Dans l'étude menée par Hara et *al.*, une différence significative de diversité  $\beta$  a été observée dans la composition bactérienne entre les enfants allergiques et les enfants non allergiques âgés d'un an et demi.<sup>102</sup> De même, l'étude de Fazlohallahi et *al.*, a évalué les différences de composition entre les échantillons en mesurant la diversité  $\beta$  à l'aide des distances UniFrac non pondérées. La PERMANOVA (analyse de variance multivariée par permutation) a permis de tester cette diversité  $\beta$  en se basant sur les distances UniFrac.<sup>74</sup> Les résultats ont montré que les enfants allergiques aux œufs présentaient une composition différente de diversité microbienne par rapport aux non allergiques.<sup>74</sup>

Dans cette présente étude, des analyses d'abondance différentielle ont été effectuées au niveau des genres et des phylums afin de déterminer si les variations observées dans les communautés microbiennes entre les groupes avant et après l'ITO traduisent une normalisation de l'abondance de certains taxons. Au niveau des genres, aucune différence significative n'a été détectée entre les enfants allergiques avant et après l'ITO.

Un total de 11 genres bactériens étaient enrichis chez les témoins non allergiques par rapport aux individus allergiques avant l'ITO. Dans la littérature, des résultats similaires ont été rapportés pour sept des genres bactériens les plus significativement enrichis (*Romboutsia*, *Megamonas*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Eggerthella*, *Escherichia/Shigella*, *Blautia*, *Streptococcus*), associés aux AA, mais spécifiquement enrichis chez les témoins non allergiques.<sup>30,101,103,104</sup> Les genres *Romboutsia*, *Megamonas* et *Clostridium sensu stricto 1* étaient enrichis chez les témoins non allergiques dans l'étude de Kanchongkittiphon et al.<sup>103</sup> De plus, *Eggerthella*, *Escherichia/Shigella* et *Blautia* étaient plus abondants chez les contrôles non allergiques que chez les patients atteints d'AA.<sup>30,101,104</sup> Les proportions de *Streptococcus* dans la composition microbienne des nourrissons variaient avec le temps, atteignant un pic le troisième jour de vie avant de diminuer progressivement, tout en restant plus élevées chez les contrôles non allergiques que dans le groupe allergique.<sup>104</sup>

Parmi les 19 genres bactériens identifiés comme enrichis chez les individus atteints d'AA avant l'ITO par rapport aux contrôles non allergiques, les huit genres bactériens les plus significativement enrichis (*Parasutterella*, *Lachnospira*, *Bacteroides*, *[Eubacterium] siraeum group*, *Akkermansia*, *Sutterella*, *[Eubacterium] ruminantium group*, *[Eubacterium] oxidoreducens group*) comprenaient cinq genres associés aux AA selon la littérature.<sup>100,105-107</sup> Le genre bactérien le plus enrichi était *Parasutterella*, connu dans la littérature pour son association avec les AA et considéré comme une bactérie pro-inflammatoire.<sup>105,106</sup> Les genres bactériens *Lachnospira* et *Sutterella* ont également été identifiés dans une étude précédente comme étant enrichis chez les patients atteints

d'AA.<sup>107</sup> Dans une étude menée sur des souris, le groupe *Eubacterium siraeum* était réduit après l'administration d'inuline, une fibre alimentaire, et était positivement associé à une augmentation des IgE sériques, suggérant ainsi un mécanisme potentiel reliant les fibres alimentaires au microbiome et au niveau d'IgE. De plus, le groupe *Eubacterium oxidoreducens* a été trouvé positivement corrélé aux AA dans une étude impliquant 60 enfants, dont 33 atteints d'AA et 27 contrôles.<sup>100</sup>

Des analyses d'abondance différentielle ont également été effectuées au niveau des phylums. Bien que tous les résultats ne soient pas significatifs, une tendance prometteuse vers une normalisation des niveaux, similaires à ceux observés chez les contrôles, a été constatée après l'ITO pour les cinq phylums étudiés. Certains résultats significatifs viennent renforcer cette observation et soulignent l'importance de poursuivre les recherches pour valider ces tendances.

En particulier, les phylums *Bacteroidota* et *Verrucomicrobiota* ont montré une abondance réduite chez les enfants après l'ITO, par rapport à leur niveau avant traitement. Ces phylums étaient également moins abondants chez les contrôles en comparaison avec les enfants allergiques avant l'ITO, suggérant un possible retour vers un profil microbien associé à la non-allergie. Le phylum *Verrucomicrobiota* a été trouvé dans une étude antérieure enrichi chez les enfants allergiques aux œufs par rapport aux enfants non allergiques.<sup>74</sup> De plus, une étude précédente sur des enfants souffrant d'allergie aux protéines de lait de vache a montré une abondance accrue du phylum *Bacteroidota* par rapport aux enfants sains.<sup>108</sup> Ces deux études valident les différences observées entre les enfants allergiques et les contrôles dans cette étude, mais cette étude est la première à documenter la réversion de leur abondance après ITO. Le phylum *Pseudomonadota* a également été trouvé plus abondant chez les enfants allergiques avant ITO par rapport aux enfants après ITO, mais la comparaison entre les contrôles non allergiques et les enfants allergiques n'a pas atteint la signification statistique. Des recherches antérieures ont également identifié ce phylum comme

significativement plus élevé dans le lait maternel des nourrissons souffrant d'AA comparés aux contrôles, ce qui est cohérent avec les résultats de cette présente étude.<sup>101</sup>

Parmi les limitations de notre étude, la taille relativement petite de l'échantillon pourrait avoir influencé les résultats. Une cohorte plus large aurait probablement permis d'identifier un plus grand nombre de genres ou d'observer chaque genre dans davantage d'échantillons, augmentant ainsi la puissance statistique de l'analyse surtout à ce niveau taxonomique. Cependant, il est important de souligner que cette étude inclut un nombre d'enfants atteints d'allergies alimentaires comparable à celui d'autres études similaires dans ce domaine.<sup>100,103</sup> Par exemple, les seules autres études ayant exploré l'impact de l'immunothérapie orale (ITO) sur le microbiome intestinal concernaient respectivement un échantillon de sept adultes et un autre de 32 enfants d'âge scolaire.<sup>23,96</sup> Une autre limitation concerne la faible taille de l'échantillon de témoins (n=7), reflétant la difficulté de recruter des enfants non allergiques, ainsi que des différences méthodologiques entre les enfants atteints d'AA et les témoins, dues à l'évolution des protocoles de laboratoire au fil du temps. Cependant, ce protocole a permis de valider des résultats déjà observés dans la littérature entre les enfants allergiques et les témoins, offrant ainsi un niveau de confiance acceptable pour évaluer si l'ITO induit une réversion possible des niveaux d'abondance de certains taxons vers des niveaux observés chez les personnes sans AA. Une autre limitation de cette étude réside dans l'utilisation du séquençage ciblé du gène 16S rRNA au lieu d'un séquençage métagénomique complet. Bien que cette approche soit utile pour la classification bactérienne, elle offre une résolution phylogénétique limitée au niveau des espèces et un pouvoir discriminatoire réduit pour certains genres.<sup>109</sup> De plus, l'impact potentiel des antibiotiques sur le MI n'a pas été pris en compte, ce qui constitue une limitation supplémentaire.

Malgré ces limitations, l'étude menée se distingue par son approche innovante, étant la première à explorer les changements dans la composition du microbiote intestinal après une ITO

chez des enfants présentant différentes AA, tout en intégrant un groupe témoin. Ce design unique a permis d'étudier l'impact potentiel de l'ITO sur la modulation des niveaux d'abondance de certains taxons. Elle a aussi permis d'observer que le traitement modulait l'abondance de taxons en les ramenant au niveau des personnes dans AA. Ces résultats permettent de voir l'effet de l'ITO sur la diversité microbienne intestinale et pourraient contribuer à l'amélioration de ce traitement notamment par l'intégration de probiotiques dans les stratégies thérapeutiques. En effet, l'ajout de probiotiques adaptés au profil microbien des patients représente une piste prometteuse pour moduler le microbiote intestinal et ainsi optimiser la prise en charge des allergies alimentaires.

Les résultats obtenus dans cette étude soulèvent plusieurs pistes de recherche intéressantes. Une première perspective consisterait à évaluer la stabilité du microbiote intestinal chez des individus non allergiques à différents moments de leur vie, à travers un suivi longitudinal. Cette approche permettrait de mieux caractériser la variabilité intra-individuelle naturelle du microbiote, une donnée essentielle pour distinguer les altérations spécifiques induites par l'immunothérapie orale des fluctuations physiologiques propres à chaque individu. Par ailleurs, une augmentation de la taille de l'échantillon, en particulier pour les groupes témoins, serait souhaitable afin d'améliorer la puissance statistique des analyses, de permettre une meilleure stratification selon les types d'allergènes, et d'explorer plus finement les différences selon les profils de réponse clinique à l'ITO. Enfin, le recours à des techniques de séquençage à plus haute résolution, telles que le séquençage métagénomique shotgun, offrirait une vision plus détaillée du microbiote intestinal, à la fois en termes de composition taxonomique précise (au niveau des espèces) et de fonctions métaboliques. Cette approche permettrait ainsi de mieux caractériser la diversité microbienne associés à la désensibilisation ou à la tolérance, et à élaborer des études fonctionnelles sur le rôle des micro-organismes ciblés afin de développer des outils diagnostiques ou thérapeutiques basés sur des signatures microbiennes fonctionnelles.

## CONCLUSION

Cette étude met en évidence des changements significatifs dans la composition et la diversité du microbiote intestinal (MI) chez les enfants souffrant d'allergies alimentaires (AA), avant et après l'ITO, ainsi qu'entre les enfants allergiques avant traitement et les témoins non allergiques. Notamment, des biomarqueurs spécifiques ont été identifiés, incluant deux phylums dont les niveaux d'abondance ont été inversés par l'ITO. Ces résultats fournissent des informations précieuses sur l'impact de l'ITO sur le MI et soulignent le potentiel de l'ITO à moduler ces altérations.

Grâce aux activités de la Clinique de recherche Zéro allergie, plusieurs nouveaux enfants allergiques et leurs frères et sœurs non allergiques sont recrutés chaque année dans la cohorte Zéro allergie (ZAC).<sup>110</sup> Chaque participant, en plus d'être cliniquement évalué et de participer à la désensibilisation par ITO, contribue à la biobanque avec un échantillon sanguin, des écouvillons buccaux et un échantillon de selle pour documenter le MI, avant et après la phase d'augmentation des doses d'ITO. Les résultats de cette étude contribueront grandement à mieux comprendre le développement des AA et éventuellement à faire progresser leur prévention et leur traitement.

Pour terminer, ces résultats soulignent le rôle crucial du MI dans les AA et le potentiel de l'ITO à rétablir l'équilibre microbien. Associée aux efforts continus de collecte de données, cette étude constitue une étape importante pour améliorer à réduire les risques de réactions allergiques graves et, en définitive, renforcer la qualité de vie des enfants souffrant d'AA et de leurs familles.

## BIBLIOGRAPHIE

1. De Martinis, M., Sirufo, M.M., Suppa, M. & Ginaldi, L. New perspectives in food allergy. *International journal of molecular sciences* **21**, 1474 (2020).
2. Seth, D., Poowutikul, P., Pansare, M. & Kamat, D. Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann* **49**, e50-e58 (2020).
3. Cosme-Blanco, W., Arroyo-Flores, E. & Ale, H. Food Allergies. *Pediatr Rev* **41**, 403-415 (2020).
4. Sampath, V. *et al.* Food allergy across the globe. *J Allergy Clin Immunol* **148**, 1347-1364 (2021).
5. Cheng, Y. *et al.* The Roles and Mechanisms of Gut Microbiota in Food Allergy. *Advanced Gut & Microbiome Research* **2023**, 1-16 (2023).
6. Peters, R.L., Krawiec, M., Koplin, J.J. & Santos, A.F. Update on food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* **32**, 647-657 (2021).
7. Ozdemir, P.G., Sato, S., Yanagida, N. & Ebisawa, M. Oral Immunotherapy in Food Allergy: Where Are We Now? *Allergy Asthma Immunol Res* **15**, 125-144 (2023).
8. Freeland, D.M.H. *et al.* Oral immunotherapy for food allergy. in *Seminars in immunology* Vol. 30 36-44 (Elsevier, 2017).
9. Kazmi, W. & Berin, M.C. Oral tolerance and oral immunotherapy for food allergy: Evidence for common mechanisms? *Cell Immunol* **383**, 104650 (2023).
10. Biedermann, L. & Rogler, G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European journal of pediatrics* **174**, 151-167 (2015).
11. Shu, S.-A. *et al.* Microbiota and food allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology* **57**, 83-97 (2019).
12. Akagawa, S. & Kaneko, K. Gut microbiota and allergic diseases in children. *Allergol Int* **71**, 301-309 (2022).
13. Magurran, A.E. *Measuring biological diversity*, (John Wiley & Sons, 2013).
14. Lozupone, C.A. & Knight, R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 557-78 (2008).
15. Jost, L. Entropy and diversity. *Oikos* **113**, 363-375 (2006).
16. Chao, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265-270 (1984).



17. Gaggiotti, O.E. *et al.* Diversity from genes to ecosystems: A unifying framework to study variation across biological metrics and scales. *Evol Appl* **11**, 1176-1193 (2018).
18. Chao, A. & Shen, T.-J. *Environmental and Ecological Statistics* **10**, 429-443 (2003).
19. Goldberg, M.R. *et al.* Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Med* **12**, 92 (2020).
20. Ling, Z. *et al.* Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Applied and environmental microbiology* **80**, 2546-2554 (2014).
21. Bunyavanich, S. Food allergy: could the gut microbiota hold the key? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 201-202 (2019).
22. He, Z. *et al.* Increased diversity of gut microbiota during active oral immunotherapy in peanut-allergic adults. *Allergy* **76**, 927-930 (2021).
23. Shibata, R. *et al.* Gut microbiota and fecal metabolites in sustained unresponsiveness by oral immunotherapy in school-age children with cow's milk allergy. *Allergology International* **73**, 126-136 (2024).
24. Essari, L., Khayat, N., Rancé, F. & de Blay, F. Allergies alimentaires chez l'enfant et l'adulte. *Nutrition clinique pratique: Chez l'adulte, l'enfant et la personne âgée*, 261 (2018).
25. Satitsuksanoa, P., Jansen, K., Głobińska, A., Van de Veen, W. & Akdis, M. Regulatory immune mechanisms in tolerance to food allergy. *Frontiers in immunology* **9**, 2939 (2018).
26. Parrish, C.P. & Kim, H. Food-induced anaphylaxis: an update. *Current Allergy and Asthma Reports* **18**, 1-12 (2018).
27. Iweala, O.I., Choudhary, S.K. & Commins, S.P. Food allergy. *Current gastroenterology reports* **20**, 1-6 (2018).
28. Dubuc-Fortin, E., Marquis, M. & Scuralli, S. Prévalence, facteurs de risque et conséquences des allergies alimentaires chez les enfants d'âge scolaire. *Nutrition Science en évolution* **18**, 9-15 (2020).
29. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, 41-58 (2018).
30. Davis, E.C., Jackson, C.M., Ting, T., Harizaj, A. & Järvinen, K.M. Predictors and biomarkers of food allergy and sensitization in early childhood. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **129**, 292-300 (2022).
31. Barni, S. *et al.* Immunoglobulin E (IgE)-mediated food allergy in children: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Medicina* **56**, 111 (2020).

32. Anvari, S., Miller, J., Yeh, C.-Y. & Davis, C.M. IgE-mediated food allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology* **57**, 244-260 (2019).
33. Gupta, R.S. *et al.* Prevalence and severity of food allergies among US adults. *JAMA network open* **2**, e185630-e185630 (2019).
34. Sicherer, S.H. & Sampson, H.A. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**, 291-307. e5 (2014).
35. Hamilton, R.G. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S284-S296 (2010).
36. Abrams, E.M. & Sicherer, S.H. Diagnosis and management of food allergy. *CMAJ* **188**, 1087-1093 (2016).
37. Panel, N.-S.E. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **126**, S1-S58 (2010).
38. Lieberman, J.A., Cox, A.L., Vitale, M. & Sampson, H.A. Outcomes of office-based, open food challenges in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 1120-1122 (2011).
39. Kattan, J.D. & Sicherer, S.H. Optimizing the diagnosis of food allergy. *Immunology and Allergy Clinics* **35**, 61-76 (2015).
40. Fleischer, D.M. *et al.* Allergic reactions to foods in preschool-aged children in a prospective observational food allergy study. *Pediatrics* **130**, e25-e32 (2012).
41. Wood, R.A. Oral Immunotherapy for Food Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* **27**, 151-159 (2017).
42. Hwang, D.W., Nagler, C.R. & Ciaccio, C.E. New and emerging concepts and therapies for the treatment of food allergy. *Immunotherapy Advances* **2**(2022).
43. Kulis, M., Wright, B.L., Jones, S.M. & Burks, A.W. Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies. *Gastroenterology* **148**, 1132-1142 (2015).
44. Burks, A.W. *et al.* Sublingual immunotherapy for peanut allergy: long-term follow-up of a randomized multicenter trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **135**, 1240-1248. e3 (2015).
45. Jones, S.M., Burks, A.W. & Dupont, C. State of the art on food allergen immunotherapy: oral, sublingual, and epicutaneous. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 318-23 (2014).
46. Montalto, M., D'onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A. & Gasbarrini, G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements* **3**, 30-34 (2009).

47. Landman, C. & Quevrain, E. [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *Rev Med Interne* **37**, 418-23 (2016).
48. Power, S.E., O'Toole, P.W., Stanton, C., Ross, R.P. & Fitzgerald, G.F. Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition* **111**, 387-402 (2014).
49. Poto, R. *et al.* The role of gut microbiota and leaky gut in the pathogenesis of food allergy. *Nutrients* **16**, 92 (2023).
50. Yatsunenکو, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature* **486**, 222-227 (2012).
51. Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A. & Brown, P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**, e177 (2007).
52. Wu, G.D. *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**, 105-108 (2011).
53. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**, 1332-1345 (2016).
54. Nuriel-Ohayon, M., Neuman, H. & Koren, O. Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in microbiology* **7**, 1031 (2016).
55. Skypala, I.J. & McKenzie, R. Nutritional Issues in Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* **57**, 166-178 (2019).
56. Akagawa, S. *et al.* Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in neonates. *Annals of Nutrition and Metabolism* **74**, 132-139 (2019).
57. Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S. & Isolauri, E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **9**, 565-576 (2012).
58. Koenig, J.E. *et al.* Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4578-4585 (2011).
59. Rogier, E.W. *et al.* Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 3074-3079 (2014).
60. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L. & Relman, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology* **6**, e280 (2008).
61. Metsälä, J. *et al.* Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clinical & Experimental Allergy* **45**, 137-145 (2015).

62. Persaud, R.R. *et al.* Perinatal antibiotic exposure of neonates in Canada and associated risk factors: a population-based study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **28**, 1190-1195 (2015).
63. Azad, M.B. *et al.* Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* **123**, 983-993 (2016).
64. Stefka, A.T. *et al.* Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 13145-13150 (2014).
65. Love, B.L. *et al.* Antibiotic prescription and food allergy in young children. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **12**, 1-8 (2016).
66. Hirsch, A.G. *et al.* Early-life antibiotic use and subsequent diagnosis of food allergy and allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy* **47**, 236-244 (2017).
67. Goodrich, J.K. *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* **159**, 789-799 (2014).
68. Azad, M.B. *et al.* Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **9**, 1-9 (2013).
69. Zhao, W., Ho, H.-e. & Bunyavanich, S. The gut microbiome in food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **122**, 276-282 (2019).
70. Goldberg, M.R. *et al.* Microbial signature in IgE-mediated food allergies. *Genome Medicine* **12**, 1-18 (2020).
71. De Filippis, F. *et al.* Specific gut microbiome signatures and the associated pro-inflammatory functions are linked to pediatric allergy and acquisition of immune tolerance. *Nature Communications* **12**, 5958 (2021).
72. Savage, J.H. *et al.* A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* **73**, 145-152 (2018).
73. Łoś-Rycharska, E. *et al.* A Combined Analysis of Gut and Skin Microbiota in Infants with Food Allergy and Atopic Dermatitis: A Pilot Study. *Nutrients* **13**, 1682 (2021).
74. Fazlollahi, M. *et al.* Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* **73**, 1515-1524 (2018).
75. Azad, M.B. *et al.* Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clinical & Experimental Allergy* **45**, 632-643 (2015).
76. Tanes, C. *et al.* Role of dietary fiber in the recovery of the human gut microbiome and its metabolome. *Cell host & microbe* **29**, 394-407. e5 (2021).

77. Shen, N. & Clemente, J.C. Engineering the microbiome: a novel approach to immunotherapy for allergic and immune diseases. *Current allergy and asthma reports* **15**, 1-10 (2015).
78. Simpson, H.L. & Campbell, B.J. dietary fibre–microbiota interactions. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **42**, 158-179 (2015).
79. Bron, P.A., Van Baarlen, P. & Kleerebezem, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 66-78 (2012).
80. Shi, J., Wang, Y., Cheng, L., Wang, J. & Raghavan, V. Gut microbiome modulation by probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics: A novel strategy in food allergy prevention and treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **64**, 5984-6000 (2024).
81. Lu, W. *et al.* Probiotic strains alleviated OVA-induced food allergy in mice by regulating the gut microbiota and improving the level of indoleacrylic acid in fecal samples. *Food & Function* **13**, 3704-3719 (2022).
82. Mennini, M. *et al.* Gut microbiota profile in children with IgE-mediated cow's milk allergy and cow's milk sensitization and probiotic intestinal persistence evaluation. *International journal of molecular sciences* **22**, 1649 (2021).
83. Gibson, G.R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **14**, 491-502 (2017).
84. Akutko, K. & Stawarski, A. Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Medicine* **10**, 2466 (2021).
85. Swanson, K.S. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **17**, 687-701 (2020).
86. Fukaya, M. *et al.* Impact of synbiotics treatment on bacteremia induced during neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer: A randomised controlled trial. *Clinical Nutrition* **40**, 5781-5791 (2021).
87. Salminen, S. *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **18**, 649-667 (2021).
88. de Lima Barros, S.É., dos Santos Rocha, C., de Moura, M.S.B., Barcelos, M.P. & da Silva Hagemel, L.I. Potential beneficial effects of kefir and its postbiotic, kefirin, on child food allergy. *Food & Function* **12**, 3770-3786 (2021).
89. Feehley, T. *et al.* Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature medicine* **25**, 448-453 (2019).

90. Bunyavanich, S. & Schadt, E.E. Systems biology of asthma and allergic diseases: a multiscale approach. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 31-42 (2015).
91. Thompson-Chagoyan, O.C., Vieites, J.M., Maldonado, J., Edwards, C. & Gil, A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy—a Spanish prospective case–control 6-month follow-up study. *Pediatric Allergy and Immunology* **21**, e394-e400 (2010).
92. Weinstock, G.M. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* **489**, 250-256 (2012).
93. Johnson, J.S. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* **10**, 5029 (2019).
94. Savage, J.H. *et al.* A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* **73**, 145-152 (2018).
95. Azad, M.B. *et al.* Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* **45**, 632-43 (2015).
96. He, Z. *et al.* Increased diversity of gut microbiota during active oral immunotherapy in peanut allergic adults. *Allergy* **76**, 927 (2021).
97. Bunyavanich, S. *et al.* Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **138**, 1122-1130 (2016).
98. Goldberg, M. *et al.* Distinctive gut microbiota signature in persistent IgE-mediated food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, AB189 (2019).
99. Ho, H.-e. & Bunyavanich, S. Microbial adjuncts for food allergen immunotherapy. *Current Allergy and Asthma Reports* **19**, 1-11 (2019).
100. Lee, K.H. *et al.* Dysfunctional Gut Microbiome Networks in Childhood IgE-Mediated Food Allergy. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 2079 (2021).
101. Wang, S., Wei, Y., Liu, L. & Li, Z. Association between breastmilk microbiota and food allergy in infants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, 770913 (2022).
102. Hara, M. *et al.* Gut microbiota of one-and-a-half-year-old food-allergic and healthy children. *Allergology International* (2024).
103. Kanchongkittiphon, W. *et al.* Characterization of gut microbiome profile in children with confirmed wheat allergy. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 000-000 (2024).
104. Wang, S. *et al.* Relationship between maternal–infant gut microbiota and infant food allergy. *Frontiers in Microbiology* **13**, 933152 (2022).
105. Rachid, R.A. *et al.* Food allergy in infancy is associated with dysbiosis of the intestinal microbiota. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, AB235 (2016).

106. Abbring, S. *et al.* Raw milk-induced protection against food allergic symptoms in mice is accompanied by shifts in microbial community structure. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3417 (2021).
107. Zhu, Z., Hu, C., Liu, Y., Wang, F. & Zhu, B. Inulin has a beneficial effect by modulating the intestinal microbiome in a BALB/c mouse model. *Beneficial Microbes* **14**, 371-383 (2023).
108. Xiong, J. *et al.* Alterations of the gut microbiota and short chain fatty acids in necrotizing enterocolitis and food protein-induced allergic proctocolitis infants: A prospective cohort study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, 1030588 (2022).
109. Janda, J.M. & Abbott, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**, 2761-4 (2007).
110. Tremblay, B.L. *et al.* Zero allergy research clinic: a clinical and research initiative in oral immunotherapy for managing IgE-mediated food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol* **20**, 59 (2024).

## **CERTIFICATION ÉTHIQUE**

Ce mémoire a fait l'objet d'une certification éthique. Le numéro du certificat est le 2023-820.



## ANNEXE 1

### Supplementary Tables

**Table 5.** Table summarizing results of the differential abundance analysis of the bacterial phyla identified.

Phylum	Comparison between food allergic children before and after oral immunotherapy		Comparison between controls and food allergic children before oral immunotherapy	
	LFC <sup>a</sup>	FDR	LFC <sup>a</sup>	FDR
Bacteroidota	-0.53	0.02	2.40	3.19e-03
Verrucomicrobiota	-0.84	0.03	3.22	1.80e-08
Pseudomonadota	-0.56	0.03	1.36	0.24
Actinomycetota	0.27	0.59	-0.00	1.00
Firmicutes	-0.13	0.59	0.74	0.25

<sup>a</sup>For the comparison between food allergic children before (T0 FA) vs after (T1 FA) oral immunotherapy, positive log fold change (LFC) values indicate bacterial phyla enriched in T1 FA compared to T0 FA and vice versa for negative LFC values. For the comparison between controls and food allergic children before (T0 FA) oral immunotherapy, positive log fold change (LFC) values indicate bacterial phyla enriched in T0 FA compared to controls and vice versa for negative LFC values.

Abbreviations: FDR = false discovery rate; LFC = log fold change.

**Table 6.** Table summarizing significant results of the differential abundance analysis (FDR < 0.05) comparing controls to food allergic children before oral immunotherapy.

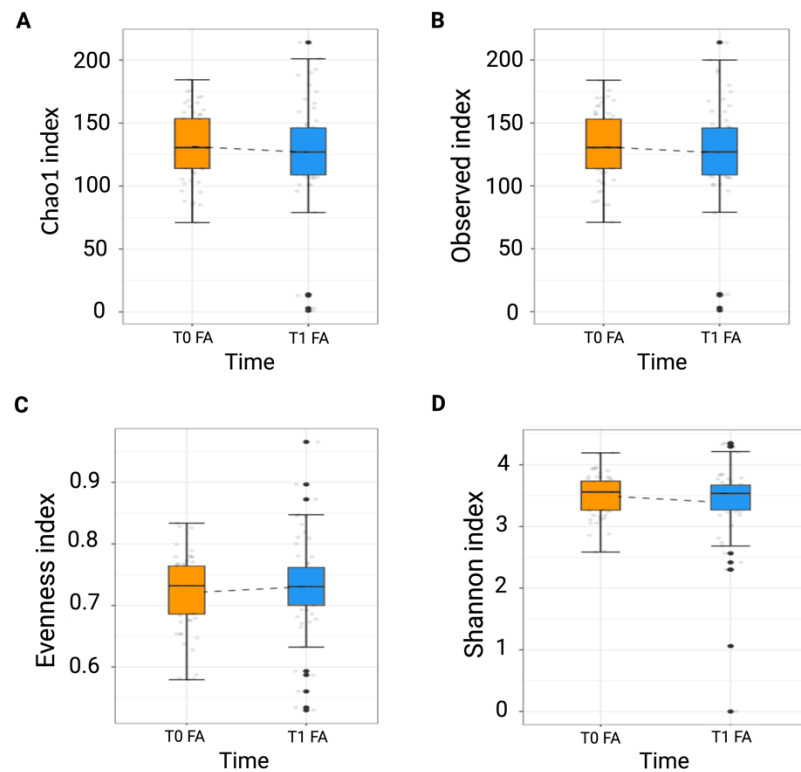
Genus	LFC <sup>a</sup>	FDR
<i>Anaerotruncus</i>	-1.23	0.02
<i>Negativibacillus</i>	-1.72	0.02
<i>[Eubacterium] oxidoreducens</i> group	1.91	6.97e-04
<i>Butyricimonas</i>	1.49	8.57e-04
<i>Intestinibacter</i>	-1.78	4.56e-04
<i>Romboutsia</i>	-3.23	1.90e-07
<i>Eisenbergiella</i>	-1.21	6.41e-04
Family XIII AD3011 group	1.25	1.24e-03
<i>Eggerthella</i>	-1.81	6.97e-04
<i>Odoribacter</i>	1.96	1.93e-07
<i>Parasutterella</i>	3.54	7.05e-10
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	-2.45	2.65e-05
UCG-005	1.24	1.14e-03
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.90	0.03
<i>Megamonas</i>	-2.85	6.41e-04
<i>[Eubacterium] ruminantium</i> group	2.32	6.97e-04
<i>Lachnospira</i>	3.21	1.39e-16
<i>Barnesiella</i>	1.36	9.73e-05
<i>Bacteroides</i>	2.71	9.46e-04
<i>[Eubacterium] siraeum</i> group	2.57	1.38e-08
<i>Alistipes</i>	1.65	1.55e-04
<i>Escherichia-Shigella</i>	-3.01	9.90e-05
<i>Lachnospiraceae</i> bacterium NK4A136	1.17	8.10e-04
<i>Parabacteroides</i>	1.87	4.05e-05
<i>Flavonifractor</i>	1.24	2.73e-03
<i>Akkermansia</i>	3.22	3.77e-10
<i>Sutterella</i>	2.48	2.98e-11

<i>Streptococcus</i>	-2.29	0.03
<i>[Eubacterium] eligens</i> group	1.18	1.16e-03
<i>Blautia</i>	-2.85	1.20e-12

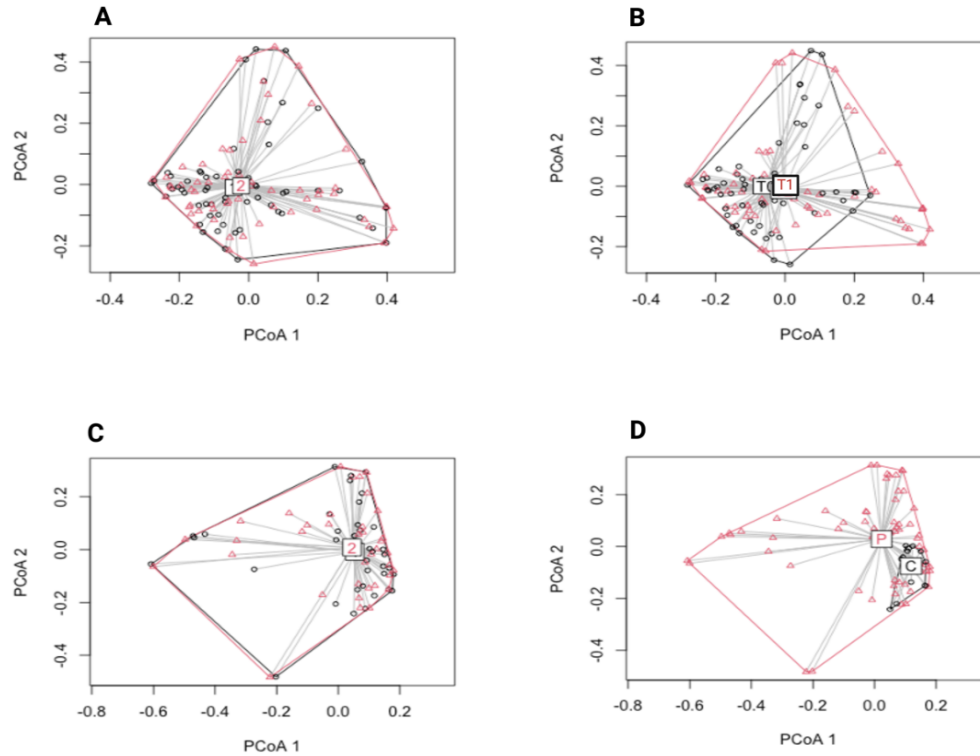
<sup>a</sup>Positive log fold change (LFC) values indicate bacterial genera enriched in food allergic children before (T0 FA) oral immunotherapy compared to controls and vice versa for negative LFC values.

Abbreviations: FDR = false discovery rate; LFC = log fold change.

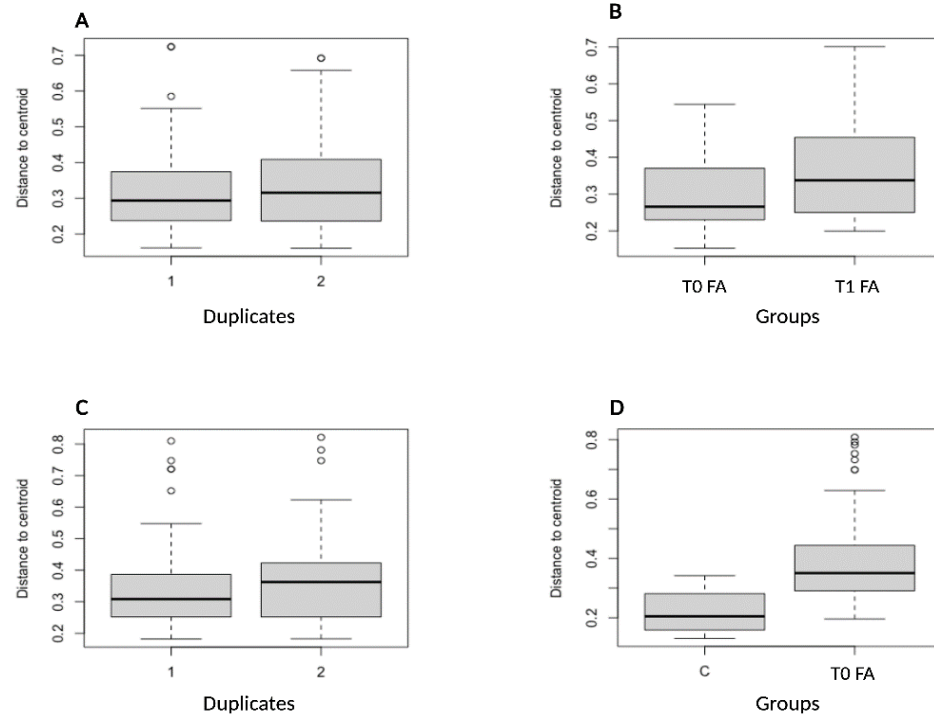
## Supplementary Figures



**Figure 10.** Alpha diversity between food allergic children before (T0 FA, orange) and after (T1 FA, blue) oral immunotherapy measured by **A:** observed index, **B:** Chao1 index, **C:** evenness index, and **D:** Shannon index. Boxes represent the quartiles, illustrating the largest distribution of both sample groups, with the line showing the median. No significant differences were found in alpha diversity indices.



**Figure 11.** Variance homogeneity of microbial diversity presented using principal coordinates analyses (PCoA) calculated from Bray Curtis dissimilarity. **A:** Replicates of the samples of the food allergic children before (T0 FA) and after (T1 FA) oral immunotherapy. **B:** Samples of T0 FA and T1 FA groups. **C:** Replicates of the samples of the controls and T0 FA groups. **D:** Samples of the controls and T0 FA groups.



**Figure 12.** Boxplots showing the distance to centroid. **A:** Replicates of the samples of T0 FA and T1 FA groups. **B:** Samples of the T0 FA and T1 FA groups. **C:** Replicates of the samples of controls and T0 FA groups. **D:** Samples of the controls and T0 FA groups.